

Aus dem Institut für Molekulare Onkologie

Direktor: Prof. Dr. Thorsten Stiewe

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

# **Die Rolle der DNA-Bindungs Kooperativität für die p53-vermittelte Tumorsuppression im Lungentumor-Xenograft-Modell**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten  
Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg,  
vorgelegt von

**Corinna Ulrike Brehm**

aus Oldenburg

Marburg, 2018

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

28.02.2018

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Thorsten Stiewe

1. Korreferent: Prof. Dr. Hans-Peter Elsässer

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>8</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>10</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>12</b>
1.1 Lungenkrebs . . . . .	12
1.2 p53 . . . . .	13
1.2.1 Die Struktur von p53 . . . . .	15
1.2.2 p53-Erkennungssequenzen in der DNA . . . . .	17
1.2.3 Die DNA-Bindungs Kooperativität von p53 . . . . .	17
1.2.4 Die Regulation von p53 durch MDM2 . . . . .	18
1.2.5 Zellzykluskontrolle durch p53 . . . . .	20
1.2.6 p53-vermittelte Apoptose . . . . .	21
1.2.7 Die Regulation der Zielgenselektion . . . . .	22
1.3 Zielsetzung der Arbeit . . . . .	24
<b>2 Material</b>	<b>27</b>
2.1 Laborgeräte . . . . .	27
2.2 Verbrauchsmaterialien . . . . .	28
2.3 Chemikalien, Reagenzien . . . . .	29
2.4 Reagenzien für die Histologie . . . . .	29
2.5 Kits . . . . .	30
2.6 Längenstandards . . . . .	30
2.7 Puffer, Lösungen und Medien . . . . .	31
2.7.1 Medien und Lösungen für die Zellkultur . . . . .	31
2.7.2 Antibiotika . . . . .	31
2.7.3 Medien, Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden . . . . .	31
2.7.4 Agarosegele zur Gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten . . . . .	32

2.7.5	Medien, Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden . . . . .	32
2.7.6	Puffer und Lösungen für die Histologie . . . . .	34
2.7.7	Plasmide . . . . .	36
2.7.8	Antikörper . . . . .	36
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>37</b>
3.1	Zellbiologische Methoden . . . . .	37
3.1.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen . . . . .	37
3.1.2	Passagieren . . . . .	37
3.1.3	Einfrieren von Zellen . . . . .	37
3.1.4	Auftauen von Zellen . . . . .	38
3.1.5	Bestimmung der Zellzahl . . . . .	38
3.1.6	Herstellung stabiler Zelllinien durch retrovirale Transduktion . . . . .	38
3.1.7	Ernten von Zellen zur Injektion in Versuchstiere . . . . .	39
3.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	39
3.2.1	Herstellung elektrokompenter Bakterien . . . . .	39
3.2.2	Transformation elektrokompenter E. Coli . . . . .	39
3.2.3	Isolation von Plasmid-DNA aus E.coli . . . . .	40
3.2.4	Restriktionsanalyse . . . . .	41
3.2.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren . . . . .	42
3.2.6	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	42
3.2.7	DNA-Gelextraktion . . . . .	43
3.2.8	DNA-Aufreinigung . . . . .	43
3.2.9	Isolation von RNA . . . . .	43
3.2.10	cDNA-Synthese . . . . .	43
3.2.11	Quantitative Realtime-PCR . . . . .	44
3.2.12	Präparation von DNA zur Sequenzierung . . . . .	45
3.3	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	46
3.3.1	Herstellung von Zelllysaten . . . . .	46
3.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford . . . . .	46
3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese . . . . .	47
3.3.4	Western Blot . . . . .	48

3.3.5	Durchflusszytometrie (FACS) . . . . .	49
3.4	Mausmethoden . . . . .	50
3.4.1	C;129S4-Rag2 <sup>tm1.1Flv</sup> Il2rg <sup>tm1.1Flv</sup> -Mäuse . . . . .	50
3.4.2	Generelle Haltungsbedingungen . . . . .	51
3.4.3	Intravenöse Injektion der H1299-Zellen . . . . .	51
3.4.4	Herstellung von Tamoxifen zur intraperitonealen Injektion . . . . .	51
3.4.5	Intraperitoneale Injektion von Tamoxifen . . . . .	52
3.4.6	Doxorubicin-Behandlung . . . . .	52
3.4.7	Kleintier-MRT . . . . .	53
3.4.8	Sektion . . . . .	53
3.4.9	Präparation der Lungen . . . . .	53
3.5	Histologische Methoden . . . . .	54
3.5.1	Fixierung der Präparate . . . . .	54
3.5.2	Entparaffinierung . . . . .	54
3.5.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung . . . . .	54
3.5.4	Fluoreszenzfärbung p53 . . . . .	55
3.5.5	Auswertung der Histologie . . . . .	56
3.6	Statistische Methoden . . . . .	56
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
4.1	Struktur und Funktionalität der H1-Helix-Mutanten in vitro . . . . .	57
4.1.1	Die DNA-Sequenzen der p53-Mutanten . . . . .	57
4.1.2	Die Proteinexpression der p53-Mutanten in den H1299-Zellen . . . . .	59
4.1.3	Nur p53-Mutanten hoher Kooperativität sind in der Lage, das pro-apoptische Gen Noxa zu induzieren . . . . .	60
4.1.4	Für die Induktion von Caspase 3 ist eine hohe DNA-Bindungs-Kooperativität essentiell . . . . .	61
4.2	Intravenös injizierte H1299-Zellen induzieren Tumore in immundefizienten Mäusen . . . . .	63
4.3	Trotz unterschiedlich kooperativer Mutanten finden sich vergleichbar viele Lungenmetastasen . . . . .	66

4.4	Die Stärke der DNA-Bindungs-Kooperativität korreliert invers mit der Anzahl der p53-positiven Metastasen und Zellen in den Lungentumoren . . . . .	70
4.5	Eine Stabilisierung von p53 durch Doxorubicin zusätzlich zur Aktivierung durch Tamoxifen hat nur bei niedriger Kooperativität signifikante zytoreduktive Effekte . . . . .	75
4.6	p53-reaktivierende Therapie reduziert p53-positive Zellen und Metastasen bei bereits bestehenden Tumoren . . . . .	77
4.7	Die Aktivierung der p53-Mutanten in der letzten Woche zeigt ähnliche tumorsuppressive Effektivität wie deren kontinuierliche Aktivierung . . . . .	81
4.8	Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse . . . . .	83
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>86</b>
5.1	Verlust von p53 in den Tumorzellen . . . . .	86
5.2	Der Einfluss der p53-Bindungs Kooperativität auf das Zellschicksal	88
5.3	Die Behandlung mit Doxorubicin . . . . .	88
5.4	Eliminierung von p53-positiven Zellen in bereits bestehenden Tumoren . . . . .	90
5.5	Eine diskontinuierliche Aktivierung von p53 gewährleistet ebenfalls effektiven Schutz vor Tumoren . . . . .	91
5.6	Kooperativitätsmutanten von p53 in humanen Tumoren . . . . .	93
5.7	Therapeutische Ansätze . . . . .	93
5.8	Ausblick . . . . .	95
	<b>Literatur</b>	<b>96</b>
	<b>Anhang</b>	<b>111</b>
	<b>Verzeichnis der akademischen Lehrer</b>	<b>113</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>114</b>

---

## Zusammenfassung

p53 wird wegen seiner herausragenden Rolle als Tumorsuppressor auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet: als Transkriptionsfaktor reguliert es die Expression zahlreicher Gene und nimmt hierdurch Einfluss auf die Zellproliferation. Bei zellulärem Stress, wie zum Beispiel bei DNA-Schädigung oder Aktivierung von Onkogenen, steigt der Spiegel von p53 in der Zelle rasch an. Mögliche Konsequenzen sind ein transienter Zellzyklusarrest, der eine DNA-Reparatur ermöglicht, die Seneszenz, ein irreversibler Zellzyklusarrest, oder die Apoptose, der programmierte Zelltod. Durch diese Maßnahmen wird die Proliferation der Zelle vorerst gestoppt und der Organismus vor Generierung und Vermehrung von Krebszellen geschützt.

Wie genau die Entscheidung zwischen transientem Zellzyklusarrest, Seneszenz und Apoptose getroffen wird, ist bis heute nicht abschließend geklärt. p53 bindet als Tetramer kooperativ an die DNA, was bedeutet, dass die Bindung des kompletten p53-Tetramers an die DNA stärker ist als die Summe der Bindungen der vier einzelnen p53-Monomere. Die Stabilität der Bindung zwischen den einzelnen p53-Molekülen beeinflusst die Auswahl der Target-Gene entscheidend und korreliert mit dem Ausmaß der induzierten Apoptose.

Um den Einfluss der DNA-Bindungs Kooperativität von p53 auf die Tumorsuppression zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit unterschiedlich stark kooperative p53-Mutanten stabil in eine p53-negative Lungenkarzinomzelllinie transfiziert. Im Lungentumor-Xenograft-Modell konnte gezeigt werden, dass sich bei höherer DNA-Bindungs Kooperativität von p53 signifikant weniger Tumore entwickeln. Eine zusätzliche Chemotherapie mit Doxorubicin vermochte die Tumormasse nochmals zu reduzieren. Diese Ergebnisse belegen eindrucksvoll die Abhängigkeit der Tumorsuppression sowie der Chemosensibilität von der DNA-Bindungs Kooperativität von p53. Interessanterweise war keine konstitutive Aktivität von p53 notwendig, sondern eine konditionelle Aktivierung ausschließlich in der letzten Behandlungswoche führte zu einem gleichwertigen tumorsuppressiven Effekt.

Dieses Wissen um die Effekte der DNA-Bindungs Kooperativität ist therapeutisch hoch interessant, da Substanzen, die die Kooperativität erhöhen und somit die Apoptoserate steigern, zur Behandlung von Tumorerkrankungen eingesetzt werden könnten. Alternativ könnte eine transiente Absenkung der Kooperativität der gesunden Körperzellen bei Chemotherapie die Nebenwirkungsrate senken.



---

## Summary

p53 is known as the “guardian of the genome” due to its remarkable role as a tumor suppressor: as a transcription factor it regulates the expression of a multitude of genes, thereby influencing cell proliferation. Under cellular stress, such as after DNA-damage or activation of oncogenes, intracellular levels of p53 can rise quickly, leading to diverse reactions. These include transient cell cycle arrest, which allows DNA repair, senescence, an irreversible form of cell cycle arrest, and apoptosis, the programmed cell death. These mechanisms can inhibit cell proliferation and thus protect the organism against generation and proliferation of cancer cells.

To date, the detailed mechanisms determining transient cell cycle arrest, senescence or apoptosis remain to be elusive. p53 binds to the DNA as a tetramer in a cooperative manner, meaning that binding-strength of the whole p53-tetramer exceeds the sum of the binding strength of the four monomers. Binding stability between the four p53-molecules crucially influences target gene selection and correlates with apoptotic rates.

The aim of this study was to investigate the influence of DNA-binding-cooperativity of p53 on its tumor suppressive capacity *in vivo*. p53-mutants with different cooperativity, ranging from extremely weak to strong, were transfected into a p53-negative lung tumor cell line. In a xenograft model it could be proven that higher DNA-binding-cooperativity leads to less tumor burden. Chemotherapy with doxorubicin additionally reduced tumor burden. These results underline a distinct dependency of tumor suppression and chemosensitivity of the tumor cells on the DNA-binding-cooperativity of p53. Interestingly, no constitutive activation of p53 was necessary, as a conditional activation of p53 only in the last week of treatment led to an equivalent effect.

The gained insights into the effects of DNA-binding-cooperativity are of substantial relevance as substances which enhance cooperativity and thereby increase apoptosis rates could be potential drugs in cancer therapy. On the other hand, transient reduction of cooperativity in healthy bystander cells during chemotherapy could reduce side effects.

---

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Begriff
A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ASSP 1/2	Apoptosis-stimulating of p53 protein 1/2
C	Cytosin
cm	Zentimeter
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
CT	Cycle Threshold
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DMEM	Dulbecco 's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR4	death-rezeptor 4
DR5	death-rezeptor 5
E	Glutamat
FACS	Durchflusszytometrie
FCS	fetales Kälberserum
G	Guanin
g	Gramm
h	Stunden
H <sub>2</sub> Odest	destilliertes Wasser
HPV-E6	humanes Papillomavirus E6
iASSP	inhibitor of ASPP
IL2-RG	Interleukin-2-Rezeptor Gamma-Ketten Gen
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
kDA	Kilodalton
L	Leucin
l	Liter
mg	Milligramm
min	Minuten

---

ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
mRNA	Messenger RNA
nm	Nanometer
NSCLC	Non-small cell lung cancer, nichtkleinzellige Bronchialkarzinome
OD	optische Dichte
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	potentia Hydrogenii
pM	Picomol
PTM	posttranslationale Modifikation
qPCR	quantitative PCR, Realtime-PCR
R	Arginin
RAG2	Recombinase Activating Gene 2
rpm	rounds per minute
s	Sekunden
s.	siehe
SCLC	Small cell lung cancer, kleinzellige Bronchialkarzinome
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
T	Thymin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
U	Unit
Wt	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Lungenkrebs

Bösartige Neubildungen der Lunge gehören zu den häufigsten Neoplasien weltweit, im Jahr 2008 sind weltweit über eine Millionen Personen an Lungenkrebs verstorben (Jemal et al., 2011). Der größte Risikofaktor ist das Rauchen, das für ca. 90% aller Fälle verantwortlich gemacht werden kann (Alberg and Samet, 2003). Lungenkrebs entsteht aus Vorläuferzellen in Bronchien, Bronchiolen und der terminalen bronchioalveolären Einheit. Histologisch lassen sich vier Entitäten unterscheiden: Das Adenokarzinom, das mit 38% aller Fälle am häufigsten ist, das Plattenepithelkarzinom mit 20% aller Fälle, das großzellige Karzinom mit 5% und das kleinzellige Bronchialkarzinom mit 13% (Travis, 2004). Wichtig ist hierbei die Unterscheidung zwischen kleinzelligen (SCLC, small cell lung cancer) und nichtkleinzelligen (NSCLC, non small cell lung cancer) Bronchialkarzinomen, die sich bezüglich Staging, Therapie und Prognose unterscheiden.

Allen Arten der Bronchialkarzinome ist die schlechte Prognose gemein - die Fünf-Jahres-Überlebensraten hängen vom Stadium bei Diagnose ab, wobei die Krankheit bei Erstdiagnose meist schon im fortgeschrittenen Stadium ist. Einerseits liegt dies daran, dass Symptome relativ spät auftreten, andererseits werden die Symptome häufig erst spät ernst genommen, da starke Raucher häufig unter Husten, Hämoptysen, Brustschmerz und Kurzatmigkeit leiden und dies zunächst nicht mit einer malignen Erkrankung in Verbindung bringen. Bei SCLC liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate im fortgeschrittenen Stadium bei nur 1-2%, bei NSCLC hängt sie vom histologischen Subtyp ab, ist aber generell etwas besser (Groome et al., 2007).

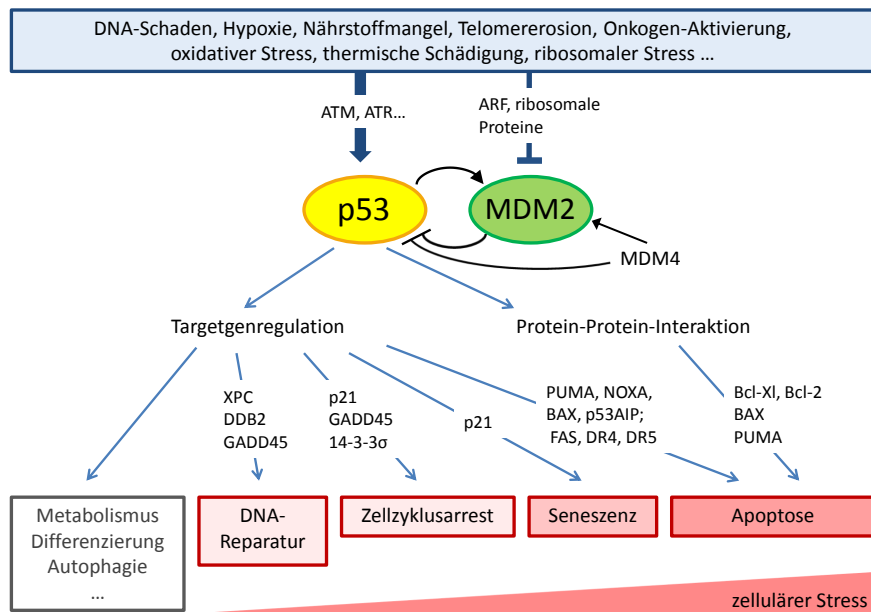
Mehr als 90% aller SCLC und 50% aller NSCLC enthalten mutiertes p53 (Wistuba et al., 2001), wobei dies verbunden ist mit einer schlechteren Prognose, sowohl bezüglich des Gesamtüberlebens, als auch bezüglich des Ansprechens auf onkologische Therapien (Steels et al., 2001). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die Mutation von p53 in der Regel einer lymphatischen Metastasierung vorausgeht (Chang et al., 2011). Diese Daten zeigen die schwerwiegende Rolle auf, die p53 in Genese und Prognose von Bronchialkarzinomen spielt. Aus der allgemein schlechten Prognose dieser Erkrankungen ergibt sich

der dringende Bedarf, neue Therapien zu entwickeln. Hierbei bietet p53 einen vielversprechenden Angriffspunkt.

## 1.2 p53

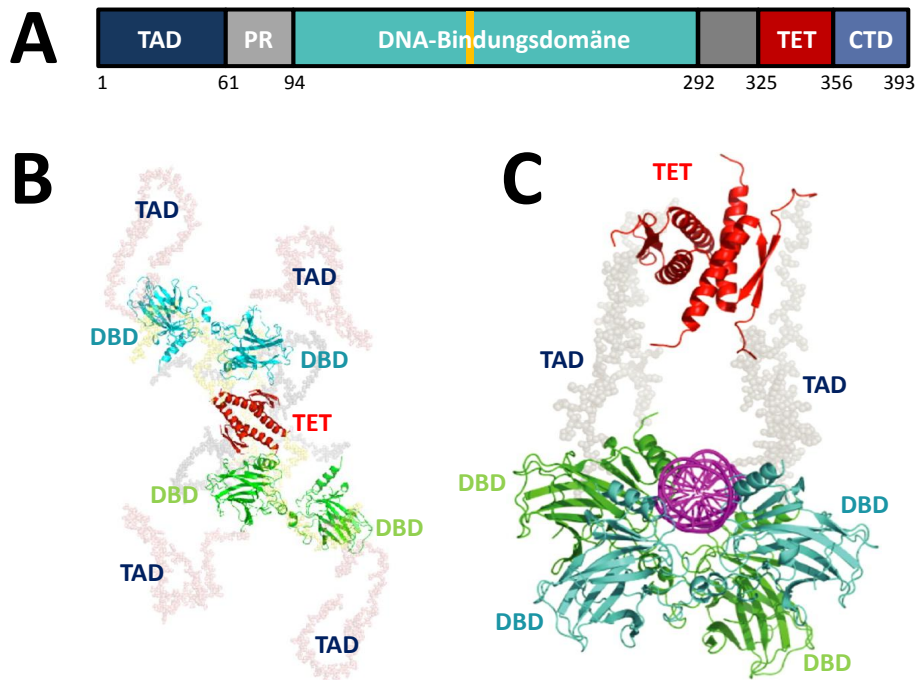
p53 ist ein Tumorsuppressor, dessen zentrale Aufgabe es ist sicherzustellen, dass sich geschädigte und prä-maligne Zellen nicht weiter replizieren können. Durch zellulären Stress wie DNA-Schaden oder Onkogenaktivierung kommt es zur Anreicherung von p53 in der Zelle (Prives and Hall, 1999). Diese Anreicherung beruht vor allem auf einer gesteigerten Proteinstabilität (Maltzman and Czyzyk, 1984, Ashcroft et al., 2000). Mit einer Halbwertszeit von 20 Minuten ist p53 ein sehr schnelllebiges Protein, es befindet sich in einer ständigen Balance zwischen Synthese und Abbau. Durch den relativ hohen Umsatz kann sichergestellt werden, dass p53, sobald benötigt, schnell in der Zelle akkumulieren kann.

Als Transkriptionsfaktor ist p53 in der Lage, verschiedene Signalübertragungswege zu beeinflussen, die zum Beispiel zu Zellzyklusarrest, Seneszenz oder Apoptose führen können, die DNA-Reparatur fördern oder den Zellmetabolismus beeinflussen (s. Abb. 1). Durch diese Maßnahmen wird die Proliferation der Zelle vorerst gestoppt und der Organismus vor Generierung und Vermehrung genetisch alterierter Zellen geschützt. Welchen dieser Effekte die Akkumulation von p53 auslöst, hängt sowohl von dessen Konzentration, als auch von dessen posttranslationaler Modifizierung ab (siehe auch 1.2.7). Auch die zelluläre Umgebung sowie der Zelltyp spielen hierbei eine Rolle (Vousden and Lu, 2002). Obwohl sich unterschiedliche Tumorentitäten in ihren genetischen Charakteristika stark unterscheiden, ist das für p53 kodierende Gen in 50% aller malignen Neoplasien mutiert (Vogelstein et al., 2000) und damit insgesamt das am häufigsten mutierte Gen in humanen Krebserkrankungen (Kandoth et al., 2013). Inaktivierung von p53 in Tumoren korreliert mit höherer Malignität, niedrigen Überlebensraten sowie schlechterem Ansprechen auf Radiochemotherapie (Chen et al., 2014).



**Abbildung 1: Der p53-Signalweg.**

Unter physiologischen Bedingungen werden die p53-Spiegel durch seinen Gegenspieler MDM2 niedrig gehalten. Stresssignale führen zu einer Stabilisierung von p53 und einer Degradierung von MDM2. Abhängig von Art und Stärke des Stresssignals leitet p53 über transkriptionelle Aktivierung von Targetgenen und direkte Interaktion mit zellulären Proteinen unterschiedliche Antworten ein, die über das weitere zelluläre Schicksal bestimmen (modifiziert nach Levine und Oren (2009) und Hao und Cho (2014)).



**Abbildung 2: Die Struktur von p53.**

(A) Domänenstruktur von p53: Die Transaktivierungsdomäne (TAD) befindet sich N-terminal. Durch eine Prolin-reiche Region (PR) getrennt schließt sich die DNA-Bindungsdomäne (DBD) an, die Region der H1-Helix ist hier gelb markiert. C-terminal folgen die Tetramerisierungsdomäne sowie die regulatorische C-terminale Domäne (nach Joerger und Fersht (2010)). (B) und (C) Quartärstruktur von freiem und an die DNA gebundenem p53 (modifiziert nach Tidow et al. (2007)). Flexible Bereiche sind grau abgebildet, die DNA ist violett dargestellt.

### 1.2.1 Die Struktur von p53

p53 ist ein flexibles Molekül, das als Homotetramer an die DNA bindet. Jedes Monomer besteht aus 393 Aminosäuren und hat namensgebend eine Masse von 53 kDa. Da große Teile des Proteins intrinsisch ungeordnet und die einzelnen funktionellen Domänen durch flexible Regionen verbunden sind, ist die Struktur variabel und p53 in kompletter Länge röntgenkristallographisch schwer darstellbar. Die Analyse einzelner stabiler Strukturen ergab drei funktionelle Domänen: am N-terminalen Ende befindet sich eine Transaktivierungsdomäne, im Zentrum des Proteins die DNA-Bindungsdomäne und am C-Terminus eine Tetramerisierungsdomäne (s. Abb. 2A). Hiermit besitzt p53 den typischen Aufbau eines sequenzspezifischen Transkriptionsfaktors.

In gelöster Form liegt p53 als kreuzähnliche Struktur vor, mittig verbunden durch die Tetramerisierungsdomänen (s. Abb. 2B). Die DNA-Bindungsdomänen sind nur lose dimerisch verbunden und können somit noch mit regulatorischen Proteinen interagieren, die z.B. für die transkriptionsunabhängige Vermittlung von Apoptose verantwortlich sind (Chipuk et al., 2005). Kommt es zur sequenzspezifischen Bindung der DNA-Bindungsdomänen an die DNA, so wickelt sich p53 um die DNA und die Gesamtstruktur stabilisiert sich (s. Abb. 2C). Die N-terminalen Transaktivierungsdomänen stehen hierbei seitlich ab und sind Ziel verschiedenster Signalproteine und posttranslationaler Modifikationen (Lavin and Gueven, 2006). Anteile der Transkriptionsmaschinerie, Koaktivatoren und negative Regulatoren wie MDM2/MDM4 binden hier und regulieren p53. Die Transaktivierungsdomäne ist intrinsisch ungeordnet und faltet sich erst durch die Interaktion mit Partnermolekülen, weshalb sie verschiedene Targetproteine mit hoher Spezifität binden kann (Joerger and Fersht, 2008). Die C-terminale Tetramerisierungs- oder Oligomerisierungsdomäne ermöglicht die Bildung des Tetramers aus den vier Monomeren und ist durch eine prolinreiche, flexible Aminosäurekette mit der DNA-Bindungsdomäne (DBD) verbunden.

Die DBD ist die größte Domäne von p53 und bindet mit Hilfe von Argininresten an die Promotoren der Zielgene. Auch sie ist strukturell variabel und hat einen relativ niedrigen Schmelzpunkt, der die Stabilität des Vollängenproteins ausmacht und wahrscheinlich einen schnelleren Wechsel zwischen gefaltetem und ungefaltetem Status und somit eine bessere Kontrolle der zellulären Proteinspiegel ermöglicht (Joerger and Fersht, 2008). Das Gerüst der DNA-Bindungs-Domäne wird durch eine Beta-Faltblatt-Struktur gebildet, an dem sich zwei große Schleifen und ein Schleife-Blatt-Motiv befinden. Diese binden an die DNA, das Schleife-Blatt-Motiv an die große Krümmung und die kürzere der beiden Schleifen an die kleine Krümmung (Cho et al., 1994). Die längere Schleife enthält zentral die H1-Helix, über die Protein-Protein-Interaktionen zwischen den DBDs der vier p53-Moleküle stattfinden.

97% der p53-Mutationen in Tumoren finden sich in der DBD, wobei es sich zumeist um Missense-Mutationen handelt, die zu einem Austausch einzelner Aminosäuren führen. Dies unterstreicht die Bedeutung der sequenzspezifischen DNA-Bindung für die tumosuppressive Wirkung von p53 (Menendez et al., 2009).



### 1.2.2 p53-Erkennungssequenzen in der DNA

p53 bindet an p53-Erkennungssequenzen (p53 Response-Elements) in der DNA und reguliert hierdurch die Transkription verschiedener Gene. Diese Erkennungssequenzen bestehen aus zwei palindromischen Dekamersequenzen der Form 5'-RRRCWWGYYY-3' (R=A,G; W=A,T; Y=C,T), die durch bis zu 21 Basenpaare getrennt sein können (Riley et al., 2008, el Deiry et al., 1992). Jeweils ein p53-Dimer bindet an eine Dekamersequenz, sodass die komplette Erkennungssequenz von vier p53-Molekülen, einem Dimer aus zwei Dimeren, besetzt wird. Hierbei kann die DNA, abhängig von der Länge der Spacer, verdreht oder gebogen werden, wodurch die Interdimer-Interaktionsfläche variabel ist, wohingegen die Intradimer-Interaktionsflächen konstanter ist.

### 1.2.3 Die DNA-Bindungs Kooperativität von p53

Verbunden sind die einzelnen p53-Monomere nicht nur über die Tetramerisierungsdomäne, sondern auch über die DBD selbst: Röntgenstrukturanalysen von an die DNA gebundenen DBDs konnten eine Tetramerbildung auch in Abwesenheit der Tetramerisierungsdomäne nachweisen (Klein et al., 2001, Rippin et al., 2002, Chen et al., 2010, Dehner et al., 2005). Die Interaktionsfläche besteht dabei aus Anteilen der L3-Schleife (Aminosäuren (AS) 243, 244) sowie aus der H1-Helix (AS 177-182). Zwischen dem negativ geladenen Glutamat an Position 180 und dem positiv geladenen Arginin an Position 181 der H1-Helices nebeneinanderliegender p53-Moleküle bilden sich Salzbrücken aus und sie tragen hierdurch zur kooperativen DNA-Bindung bei (Dehner et al., 2005; s. Abb. 3). Kooperative DNA-Bindung bedeutet, dass die Bindung des kompletten p53-Tetramers an die DNA stärker ist als die Summe der Bindung der vier einzelnen p53-Monomere.

Alternativ zu dem hier zunächst angenommenen Bindungsmodus von einem aus zwei Dimeren bestehenden Dimer wurde 2007 durch Ma und Levine die sogenannte H14-Form vorgestellt, bei der die einzelnen DBD-Domänen eine ringförmige Struktur an der DNA ausbilden (s. Abb. 3D). Auch hier kommt es zur Interaktion von Glutamat und Arginin an Position 180 und 181 in der H1-Helix der vier p53-Moleküle: im Zentrum der DBD kommt es zu einer Ringbildung mit abwechselnden positiven und negativen Ladungen und hierdurch

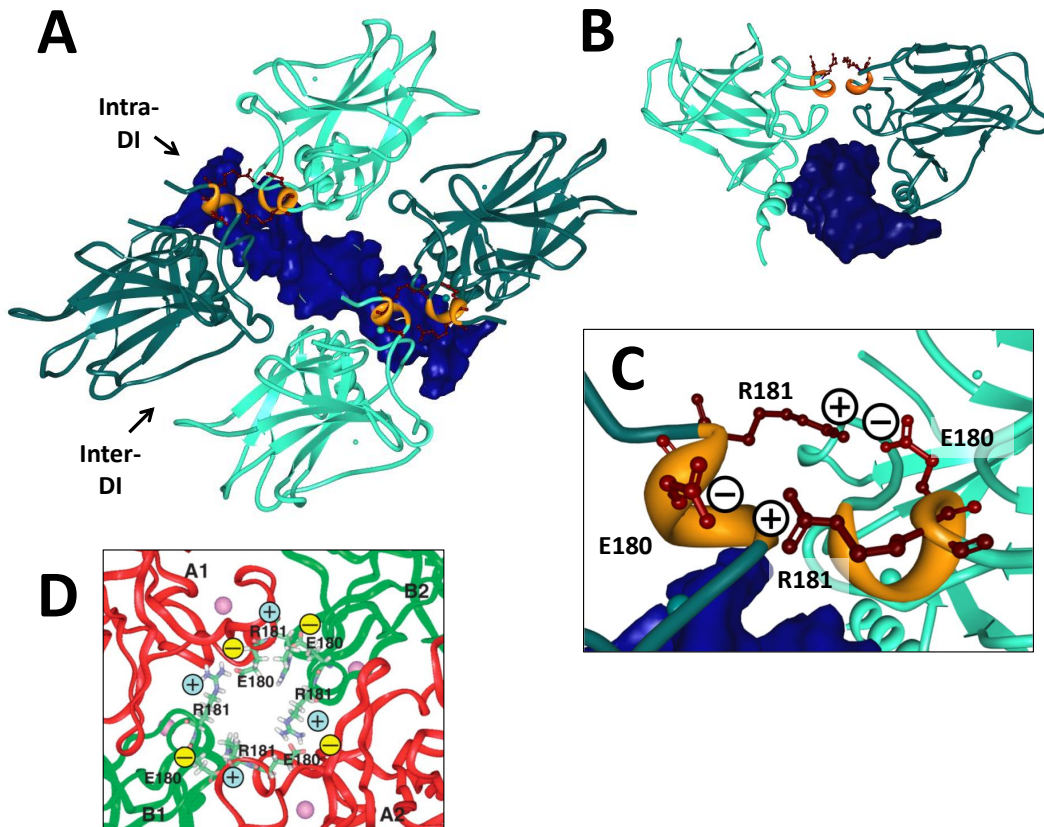
zur Stabilisierung der Bindung an die DNA (Ma and Levine, 2007). Auch in diesem durch Molekül-Dynamik-Simulationen erarbeiteten Modell spielen die DBD-Interaktionen über die H1-Helix also eine entscheidende Rolle.

#### 1.2.4 Die Regulation von p53 durch MDM2

Wie bereits erwähnt, zeichnet sich p53 durch einen hohen zellulären Umsatz aus, wird also in großer Quantität produziert und nach einer kurzen Halbwertszeit wieder abgebaut. Der schnelle Abbau sorgt für niedrige p53-Spiegel unter Normalbedingungen. Bei DNA-Schaden oder Onkogen-Aktivierung kann durch einen Abbaustopp in kurzer Zeit viel p53 akkumuliert werden, das wiederum eine zelluläre Reaktion auf diese Stresssignale einleitet (Ashcroft et al., 2000, Kubbutat and Vousden, 1998).

Die E3 Ubiquitin-Proteinligase MDM2, im menschlichen Organismus das Homolog HDM2, hält als Gegenspieler von p53 dessen Spiegel in der Zelle niedrig - durch die Bindung von MDM2 an den Aminoterminus von p53 wird die Transaktivierungsdomäne sterisch inhibiert (Oliner et al., 1993). MDM2 sorgt weiterhin für eine Ubiquitylierung von p53, markiert es hierdurch für den proteasomalen Abbau und transportiert p53 aus dem Nukleus ins Zytoplasma, wo der proteasomale Abbau umgesetzt wird (Haupt et al., 1997, Honda et al., 1997). MDM4, auch MDMX genannt, inhibiert p53 ebenfalls sterisch und trägt zum Abbau von p53 bei, wobei es keine eigene E3-Aktivität besitzt, sondern die MDM2-vermittelte Ubiquitylierung von p53 fördert (Linares et al., 2003). p53 und MDM2 sind durch eine negative Rückkopplungsschleife miteinander verbunden: MDM2 ist direktes transkriptionelles Zielgen von p53, sodass hohe zelluläre Spiegel von p53 zu einer vermehrten Expression von MDM2 und hierdurch zu einem Abbau von p53 führen (Haupt et al., 1997, Barak et al., 1993).

Unter zellulärem Stress erfolgt die Mobilisierung von p53 aus der Inhibition durch MDM2, einerseits durch posttranslationale Modifikationen von p53 und MDM2, die die Interaktion zwischen beiden Molekülen verhindern; andererseits kann es, induziert z. B. durch Onkogene, zur ARF-vermittelten Sequestration von MDM2 kommen (Weber et al., 1999). Auch ribosomaler Stress kann p53 aktivieren: Freie ribosomale Proteine, die aufgrund von ribosomalem Stress nicht an Ribosomen gebunden sind, gehen eine Bindung mit MDM2 ein und



**Abbildung 3: H1-Helix-Interaktionen von p53 tragen zur kooperativen DNA-Bindung bei.**

(A) und (B) Quartärstruktur der DNA-Bindungsdomäne (DBD) eines p53-Tetramers (nach Kitayner et al. (2010) und Moreland et al. (2005), PDB-Code 3IGK und 2ADY), gebunden an die DNA (dunkelblau): Bei der Interaktion der DBD können Intra- und Interdimerinteraktionen (Intra-DI/Inter-DI) unterscheiden werden. In (B) ist die Intradimerinteraktionsfläche von axial dargestellt, hierbei erkennt man die Interaktion der H1-Helices (orange) sowie die Salzbrücken zwischen Glutamat 180 (E180) und Arginin 181 (R181), dargestellt in rot. Detailansicht in (C). (D): H1-Helix-Interaktion bei der H14-Form (Ma and Levine, 2007). Die Monomere sind durch ringförmig angeordnete Salzbrücken zwischen E180 und R181 verbunden.

inhibieren dessen E3-Ligase-Aktivität (Hao and Cho, 2014, Zhou et al., 2012, Brady and Attardi, 2010).

Bereits erwähnt wurde, dass p53 in 50% aller malignen Neoplasien mutiert ist; dem hinzuzufügen wäre, dass in der Mehrheit der übrigen Neoplasien eine anderweitige Inaktivierung von p53 vorliegt, z. B. durch eine Überexpression von MDM2 .

### 1.2.5 Zellzykluskontrolle durch p53

Der Zellzyklus ist ein gut kontrollierter Prozess, der bei Komplettierung zur Reproduktion der Zelle führt. Ist eine Zelle Stresssignalen ausgesetzt, so kann p53 für einen vorübergehenden Zellzyklusarrest sorgen, um zum Beispiel eine DNA-Reparatur zu ermöglichen. Der Ablauf des Zellzyklus ist durch Kontrollpunkte geregelt, bei denen Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) den weiteren Progress steuern. Es existieren zwei Hauptkontrollpunkte: vor Eintritt in die S-Phase, in der die DNA-Replikation stattfindet (G1/S-Kontrollpunkt) und vor Eintritt in die M-Phase, in der die Zellteilung erfolgt (G2/M-Kontrollpunkt). Über die Induktion von p21, das für einen Inhibitor von CDKs kodiert, vermag p53 einen G1-Arrest hervorzurufen (Brugarolas et al., 1995, el Deiry, 1998). Weitere Zielgene von p53 sind GADD45 und 14-3-3 $\sigma$ , die zu einem G2-Arrest führen (Hermeking et al., 1997, Kastan et al., 1992). p53 induziert zudem die DNA-Reparatur; beispielhaft sei hier die Induktion der globalen Reparaturproteine XPC und DDB2 genannt (Gatz and Wiesmuller, 2006). Auch GADD45 bindet an DNA-Läsionen, sorgt für eine bessere Akzessibilität für Reparaturproteine und trägt hierdurch zur DNA-Reparatur bei (Carrier et al., 1999). Die Induktion von p21 erfolgt bereits bei sehr geringen Proteinkonzentrationen von p53, sodass davon auszugehen ist, dass ein temporärer G1-Block den Zellen die Möglichkeit gibt, leichtere Schäden und milden Stress zu überleben, bis diese Schäden wieder behoben sind.

Eine weitere Form der Zellzykluskontrolle ist die Seneszenz, der dauerhafte Zellzyklusarrest, der der Zelle erlaubt, weiterhin metabolisch aktiv zu sein, eine Replikation jedoch endgültig unterbindet. Auch in der Vermittlung von Seneszenz spielt p53 eine Schlüsselrolle, hauptsächlich ebenfalls über die Transaktivierung von p21 (Brown et al., 1997). Es ist davon auszugehen, dass zahlreiche präkanzeröse Läsionen, die wir alle in unserem Körper akkumulieren, durch

p53-vermittelte Seneszenz von der malignen Progression abgehalten werden (Vousden and Prives, 2009). Feldser und Greider (2007) und Cosme-Blanco et al. (2007) konnten zeigen, dass in Abwesenheit der apoptotischen Funktionen von p53 die Aktivierung zellulärer Seneszenz Tumorinitiation und -progression in vivo verhindert. Obwohl Seneszenz eine zytostatische Zellantwort ist und daher eher die Verhinderung einer Progression zu erwarten wäre, konnten Xue et al. (2007) zeigen, dass die subsequente Einschaltung des Immunsystems zur Abräumung seneszenter Zellen und damit zu einer Tumorregression führt.

### 1.2.6 p53-vermittelte Apoptose

Bei zu schwerwiegender zellulärer Schädigung ist p53 in der Lage, die betroffene Zelle mittels Apoptose aus dem Organismus zu entfernen und diesen somit vor maligne entartenden Zellen zu schützen. Bei der Initiation der Apoptose werden zwei Wege unterschieden: der extrinsische, durch Zelloberflächenrezeptoren vermittelte, sowie der intrinsische, über zellinterne Stresssignale vermittelte. p53 vermag beide Wege zu stimulieren, beeinflusst jedoch hauptsächlich den intrinsischen Weg (Vousden and Lane, 2007). Hierbei kommt es zu Permeabilisation der äußeren mitochondrialen Membran und sukzessive zur Freisetzung von Faktoren wie Cytochrom c aus dem Intermembranraum, welche die Caspase-Kaskade triggern und somit die Apoptose einleiten. Bcl-2-Proteine wie BAX und BAK sind an der Regulation des mitochondrialen Membranpotentials beteiligt und wirken proapoptotisch. Sie werden durch anti-apoptotische BH2-Proteine wie Bcl-xL und Bcl-2 reguliert. Diese wiederum stehen unter der Kontrolle von BH3-Domänen-Proteinen (Cory and Adams, 2002). p53 induziert die Transkription verschiedener proapoptotischer Proteine wie z. B. der BH3-Domänen-Proteine PUMA und NOXA, p53AIP sowie die Transkription und die direkte Aktivierung von BAX (Nakano and Vousden, 2001, Oda et al., 2000a,b, Miyashita and Reed, 1995, Chipuk et al., 2004). Den extrinsischen Weg steuert p53 durch Hochregulation von FAS-Rezeptor und death-rezeptor 4 und 5 (DR4 und DR5/KILLER) (Owen-Schaub et al., 1995, Jin and El-Deiry, 2005).

Auch transkriptionsunabhängig kann p53 den intrinsischen Weg der Apoptose aktivieren. Nach zellulärem Stress kommt es zur Translokation von p53 in die Mitochondrien, wo es zur Hemmung der antiapoptotischen Proteine

Bcl-xL und Bcl-2 und sukzessive zur Cytochrom c-Freisetzung kommt, die die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran in Gang setzt (Green and Kroemer, 2009, Vaseva and Moll, 2009).

### 1.2.7 Die Regulation der Zielgenselektion

Doch wie wird entschieden, zu welcher Zellantwort es kommt? Die Entscheidung zwischen Zellzyklusarrest, Seneszenz und Apoptose scheint hauptsächlich von der Stärke und Länge der p53-Aktivierung und der Promotorselektivität abzuhängen. Niedrige zelluläre p53-Spiegel führen eher zu einem Zellzyklusarrest, wohingegen hohe Spiegel eher zur Apoptose führen (Chen et al., 1996). Die Promotorselektivität ist abhängig von der DNA-Bindungssequenz und kann durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden. Auch mit p53 interagierende Proteine und die Spiegel antiapoptotischer Proteine sind in diesem Zusammenhang wichtig (Khoo et al., 2014).

Die zuvor beschriebene DNA-Bindungssequenz (5'-RRRCWWGYYY-3' (R=A,G; W=A,T; Y=C,T)) lässt Variationen in der Nukleotidabfolge zu, was zu unterschiedlicher Affinität der einzelnen Bindungsstellen führt (Weinberg et al., 2005). Hierbei scheinen die zentralen vier Basen der einzelnen Dekamersequenz besondere Bedeutung zu haben: im Rahmen der sequenzspezifischen Bindung kommt es in diesem Bereich zur Verdrehung der DNA. Die Basenfolge des mittleren Dinukleotides, das keinen direkten Kontakt zur p53 DBD hat, beeinflusst die Transaktivierungsaktivität am stärksten, wobei AT die höchste Aktivität aufweist (Beno et al., 2011). Die anderen Kombinationen, TA, AA und TT, besitzen eine niedrigere Bindungsaffinität. Genen, die Zellzyklusarrest induzieren, sind häufig hochaffine p53-Bindungsstellen vorgeschaltet, wohingegen Apoptose-induzierende Gene hinter niedrigaffinen Bindungsstellen liegen (Weinberg et al., 2005, Riley et al., 2008). Bei leichtem Stress und niedrigen p53-Spiegeln kommt es also zunächst zur Besetzung hochaffiner Bindungsstellen und zur Transaktivierung von Genen, die Einfluss auf den Zellzyklus nehmen, bei hohen p53-Spiegeln kommt es auch zur Transaktivierung proapoptotischer Gene.

Zusätzlich existieren Promotoren, die mehr als zwei palindromische Bindungssequenzen enthalten, was ebenfalls zu einer erhöhten Bindungsaffinität und somit zu einer stärkeren Transaktivierung führt (Riley et al., 2008).

Doch nicht nur die p53-Spiegel und die Bindungssequenz, sondern auch die intrazelluläre Umgebung, der Zelltyp sowie extrazelluläre Faktoren modifizieren die Zielgenselektion. Stresssignale wie DNA-Schädigung, Hypoxie, Nährstoffmangel, thermische Schädigung, Telomerosion oder Onkogenaktivierung werden von unterschiedlichen Signalproteinen detektiert und führen letztendlich zu posttranslationalen Modifikationen von p53 oder MDM2, die eine Stabilisierung von p53 nach sich ziehen und Einfluss auf die Promotorselektion nehmen. Hierzu zählen Phosphorylierung, Methylierung, Acetylierung, Neddylisierung und Sumoylierung (Bode and Dong, 2004). Bislang sind mehr als 36 Aminosäuren beschrieben, die posttranslational modifiziert werden können (Kruse and Gu, 2009).

Eine Phosphorylierung durch ATM an Serin 15 zum Beispiel, das im Bereich der Bindungsregion von MDM2 liegt, führt zu einer Inhibierung der MDM2-vermittelten Degradation und somit zu einer Stabilisierung von p53. Als weiteres Beispiel kann HIPK2 p53 nach Bestrahlung an Serin 46 phosphorylieren, was zur vermehrten Induktion von proapoptotischen Targetgenen wie z. B. p53AIP, nicht jedoch zur Induktion von Zellzyklusarrestgenen führt (D’Orazi et al., 2002, Vousden and Prives, 2009). Der transkriptionelle Koaktivator p300 ist essentiell für die transkriptionelle Funktion von p53; die Bindungsstellen von p300 und MDM2 überlappen sich, sodass diese um die gleiche Bindungsstelle kompetieren, es kommt hier also auf die Proteinkonzentrationen und Dissoziationskonstanten an. Auch dies kann durch posttranslationale Modifikationen (PTM) beeinflusst werden. So kann z.B. durch Phosphorylierung von Thr-18 die Bindung von MDM2 an p53 erschwert und die Bindung von p300/CBP verstärkt werden (Joerger and Fersht, 2008). Es existieren zahlreiche Publikationen über einzelne PTM und deren Auswirkung *in vitro*; problematisch ist, dass *in-vivo*-Experimente die Relevanz vieler PTM hinterfragen lassen, Redundanzen unter den PTM aufzeigen und dass bestimmte zelluläre Antworten gewebspezifisch zu sein scheinen. (Gu and Zhu, 2012, Kruse and Gu, 2009). Die Rolle von PTM von p53 *in vivo* ist also noch nicht endgültig geklärt und die Stabilisierung von p53 unter verschiedenen Arten von Stress und in unterschiedlichen Geweben lässt zahlreiche Fragen offen (Kruse and Gu, 2009). Zusätzlich beeinflussen Kofaktoren und mit p53 interagierende Proteine die Auswirkung einer p53-Akkumulation: so können z. B. ASPP1 und ASPP2

(Apoptosis-stimulating of p53 protein 1/2) die Bindung von p53 an die Promotoren proapoptotischer Gene fördern, nicht aber an die Promotoren von p21 oder MDM2. Die Expression von ASPP ist häufig eingeschränkt in Wildtyp-p53 exprimierenden Mammakarzinomen (Samuels-Lev et al., 2001, Khoo et al., 2014). iASPP (inhibitor of ASPP) hat den gegenteiligen Effekt und verhindert somit die Transaktivierung proapoptotischer Zielgene. Eine Überexpression von iASPP konnte unter anderem bei akuter myeloischer Leukämie nachgewiesen werden und scheint mit Resistenzen gegen Chemotherapie bei Ovarialkarzinomen einherzugehen (Zhang et al., 2005, Jiang et al., 2011). HPV-E6 (humanes Papillomavirus E6), ein Onkoprotein, das von den humanen Papillomaviren 16 und 18 codiert wird, die den größten Risikofaktor für Zervixkarzinome darstellen, bindet direkt an p53 und sorgt für dessen Inaktivierung und Degradation (Scheffner et al., 1990).

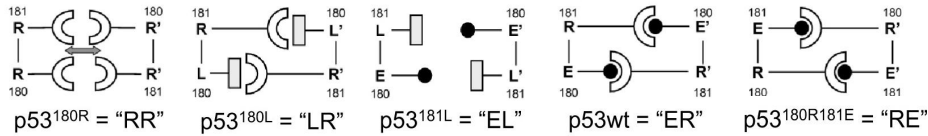
Generell scheint p53 seine Rolle als Tumorsuppressor kontext- sowie gewebsabhängig unterschiedlich auszuüben, beeinflusst von Zelltyp, Art des Stresssignals, Mikroenvironment und genetischem Hintergrund (Liu et al., 2014). Knockout einzelner wichtiger Effektorgene von p53 vermochte nicht, die tumorsuppressiven Funktionen von p53 zu unterbinden (Valente et al., 2013), was auf eine Ersetzbarkeit unterschiedlicher antiproliferativer Mechanismen von p53 hindeutet (Liu et al., 2014, Khoo et al., 2014). Es konnte gezeigt werden, dass p53-Level mit der transkriptionellen Aktivierung von Zellzyklusarrest- sowie proapoptotischen Genen korrelieren, die Induktion von Apoptose jedoch erst ab einem bestimmten Schwellenwert erfolgte (Kracikova et al., 2013). Und nicht zuletzt erfordert die Bindung von p53 an Apoptose-induzierende Gene eine hohe DNA-Bindungs Kooperativität (Schlereth et al., 2010b), ein Phänomen, das im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden sollte.

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

p53 verhindert die Replikation geschädigter und prä-maligner Zellen durch die Induktion von Zellzyklusarrest, Seneszenz oder Apoptose. Wie genau jedoch die Entscheidung zwischen diesen folgenschweren Zellantworten auf molekularer Ebene getroffen wird, welcher Mechanismus also der Zielgenselektion von p53 zu Grunde liegt, ist nach wie vor nicht abschließend geklärt.

In unserer Arbeitsgruppe wurde die Auswirkung der DNA-Bindungs Koopera-





**Abbildung 4: Die H1-Helix-Mutanten von p53.**

Schematische Darstellung der Intradimer-Verbindungen der H1-Helix-Mutanten von p53, ansteigend geordnet nach der Stärke ihrer DNA-Bindungs Kooperativität. Die Buchstaben entsprechen dem Einbuchstabencode der an Position 180 und 181 befindlichen Aminosäuren. (Modifiziert nach Schlereth et al. [2010a]).

ktivität im p53-Tetramer auf die Tumorsuppression untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Stabilität der Bindung zwischen den einzelnen p53-Molekülen die Auswahl der Target-Gene entscheidend beeinflusst. Die Interaktionsstärke und die damit verbundene DNA-Bindungs Kooperativität korrelieren hierbei mit der apoptotischen Wirkung von p53 (Schlereth et al., 2010a). Für die Untersuchungen wurden H1-Helix-Mutanten generiert, die sich in der Stärke ihrer Bindungs Kooperativität unterscheiden (s. Abb. 4). Die Intradimer-Verbindungen bestehen aus Salzbrücken zwischen den konträr geladenen Aminosäuren Glutamat 180 und Arginin 181 im Bereich der H1-Helix der DBD. Durch Austausch einzelner Aminosäuren an den Positionen 180 und 181 ließen sich diese Salzbrücken verstärken bzw. abschwächen. Die Mutanten umfassten ein Spektrum von deutlich schwächer bis stärker als der p53 Wildtyp (=Wt) und wurden nach dem jeweiligen Einbuchstabencode der an Position 180 und 181 befindlichen Aminosäuren benannt: p53 [E180R]=RR, p53 [E180L]=LR, p53 [R181L]=EL, p53 [E180R, R181E]=RE. Substitution von Glutamat oder Arginin durch ungeladene AS führte hierbei zu einer abgeschwächten H1-Helix-Interaktionsstärke und somit zu einer niedrigeren Bindungs Kooperativität, der Austausch der Positionen von Glutamat und Arginin, RE, resultierte in einer gesteigerten Bindungs Kooperativität (Schlereth et al., 2010a).

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der DNA-Bindungs Kooperativität für die p53-vermittelte Tumorsuppression *in vivo* zu untersuchen. Hierfür wurde ein Lungentumor-Xenograft-Modell gewählt, in dem die Tumorbildung in Mauslungen durch menschliche Tumorzellen mit unterschiedlich starken p53-Mutanten verglichen wurde.

Mit den unterschiedlichen p53-Mutanten wurde in induzierbarer Form gear-

beitet: durch die Verwendung des ER<sup>TAM</sup>-Systems führte die Gabe von 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) zur nukleären Translokation und damit zur Aktivierung von p53 (Littlewood et al., 1995). Aufgrund der Induzierbarkeit konnten direkte Vergleichsuntersuchungen zwischen Zellen und Versuchstieren, die sich ausschließlich in der Aktivierung von p53 unterschieden, angestellt werden. Die DNA der verschiedenen Mutanten wurde durch retrovirale Transfektion in H1299-Zellen, also in eine p53-negative Zelllinie eines Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms, eingebracht. Die proliferationsmodulierende Wirkung der p53-Mutanten wurde auf Ebene von mRNA- und Proteinexpression am Beispiel von NOXA, als proapoptotischem Mitglied der Bcl-2 Familie, in Western Blot, quantitativen RT-PCR-Analysen sowie durchflusszytometrisch untersucht. Für die In-Vivo-Analysen wurden diese Zellen intravenös in immundefiziente Mäuse injiziert und die Bildung der Lungentumore nach vier Wochen wurde histologisch analysiert.

## 2 Material

### 2.1 Laborgeräte

Absaugsystem BioChem-VacuuCenter BVC 21 NT	Vacuubrand
Autoklav Systec VE-150	Systec
Bakterienschüttler Multitron	Infors
Begasungsbrutschrank BBD 6220	Heraeus Instruments
Brutschrank/Inkubator Heraeus B6	Heraeus Instruments
CO <sub>2</sub> -Inkubator HERAcell 240i	Thermo Scientific
Einbettstation Microm Heidelberg AP250	Microm
Eismaschine AF 20	Scotsman
Elektrophoresekammer Hoefer HE 100 SuperSub	Amersham
Elektrophoresekammer Hoefer HE 33 Mini	Amersham
Elektrophoresekammer Hoefer Mighty Small SE 260	Amersham
Elektrophoresekammer XCell4 SureLock Midi-Cell	Invitrogen
Elektroporator MicroPulser	Bio-Rad
Fluoreszenz-Scanner Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences
Gel-Dokumentation mit UV-Transilluminator	Intas
Gießstand Hoefer	GE Healthcare
Kryo-Einfriergefäß Cryo 1° C Freezing Container	Nalgene
LightCycler® Mikroliterpipe 480 Real-Time PCR System	Roche
Magnetrührer IKA Combimag	IKA Labortechnik
Magnetrührer IKA RCT basic	IKA Labortechnik
Mikroliterpipetten Pipetman®	Gilson
Mikroskop Routine Microscope CKX41	Olympus
Mikroskop Olympus FSX 100	Olympus
Mikroskop Axioskop	Zeiss
Mikroskop Olympus BX61	Olympus
Mikrotom Leica RM2125RT	Leica
Netzgerät PowerPac 200 und 300	Bio-Rad
PCR System 96-Well GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
PCR System Px2 Thermal Cycler	Thermo Scientific
PCR-Werksbank Captair® Bio	Erlab
PerfectBlue Tank Electro Blotter Web S	Peqlab

pH-Meter Five Easy	Mettler Toledo
Photometer BioPhotometer	Eppendorf
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences
Präzisionswaage PLB1000-2	Kern
Realtime PCR Cycler MX3005P	Stratagene
Rollschüttler Roller Mixer SRT2	Stuart Scientific
Wärmeschrank EB53 IS+THERM	Jouan
QIAcube	Qiagen
Sonifizierer W-250D	Branson
Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	Peqlab
Stickstofftank Cryosystem 6000	MVE
Thermocycler Mastercycler Gradient	Eppendorf
Thermomixer comfort	Eppendorf
Trockenschrank VWR INCU-Line	VWR
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Vortexer Lab Dancer	IKA
Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Biocel	Millipore
Wasserbad	Memmert
Zellkulturwerkbank MSC-Advantage	Thermo Scientific
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge J2-21	Beckman

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalspritzen Omnifix®-F 1 ml	Braun
Elektroporationsküvetten	Eurogentec
Falcons Greiner Bio-One	Sarstedt
Filterspitzen Biosphere®	Sarstedt
Kanülen BD Microlance 3 (0,45 mm x 13 mm) (für intravenöse Injektion)	BD
Kanülen Sterican Gr. 20 (0,4 mm x 20 mm) (für intraperitoneale Injektion)	Braun
Kryogefäße	Greiner Bio-One
Nitrocellulose Membran Hybond ECL	Amersham

NuPAGE® Novex 4-12 % Bis-Tris Gele	Invitrogen
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reagiergefäße	Sarstedt
Spritzen Codan	Primo
Spritzenfilter Roth	Sarstedt
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell
Zellkultur Multiwell-Platten	Greiner Bio-One, Sarstedt
Zellkultur Schalen	Sarstedt

### 2.3 Chemikalien, Reagenzien

Bradford Reagenz	Bio-Rad
Corn Oil	Sigma
Doxorubicin 1,6 mg/ml in NaCl 0,9 %	Universitätsapotheker Marburg
Escort V Transfection Reagent	Sigma-Aldrich
NuPAGE Puffer	Invitrogen
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific
Tamoxifen (zur i. p. Injektion)	Fluka
Polybrene Transfection Reagent	Sigma-Aldrich

### 2.4 Reagenzien für die Histologie

Dabco (Pulver)	Roth
Entellan	Merck
Eosin (Pulver)	Merck
Glycin	Roth
Hoechst 33258	Fluka (Sigma-Aldrich)
Hämalaun	Roth
Mowiol (Pulver)	Roth
Paraffin Schmelzpunkt 44°-48° C	Merck
Paraffin Schmelzpunkt 51°-53° C	Merck
Paraplast Histocomp	Vogel
Rotihistol	Roth

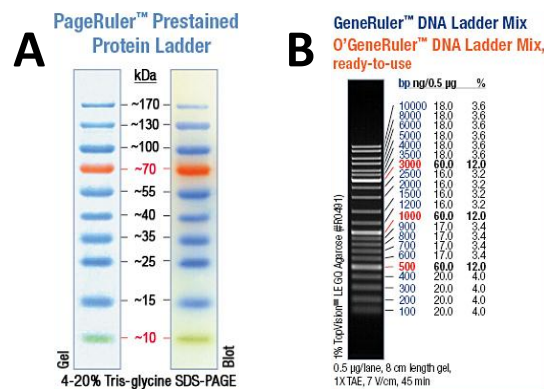
Xylol (Isomerengemisch)	Roth
Ziegenserum (Normalserum)	PAA/DAKO

## 2.5 Kits

CaspGLOW™ Fluorecein Active Caspase-3 Staining Kit	BioVision
Gateway Clonase-LR™ Enzyme Mix	Invitrogen
NucleoBond® Xtra Midi Kit Macherey	Nagel
Omniscript RT-Kit	Qiagen
PEQLAB Tissue DNA Mini Kit	Peqlab
RNeasy Mini Kit	Qiagen
SYBR-Green Jump Start Taq Ready Mix	Sigma-Aldrich
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega

## 2.6 Längenstandards

Als DNA-Längenstandard bei der Elektrophorese wurde der Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas) verwendet, um die Größe von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen abzuschätzen, wurde die PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas) eingesetzt (Abb. 5).



**Abbildung 5: Verwendete Längenstandards.**

(A) Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas) als DNA-Längenstandard bei der Elektrophorese. (B) PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas) zur Abschätzung der Größe von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen.

## 2.7 Puffer, Lösungen und Medien

### 2.7.1 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose by Gibco® (4,5 g/l D-Glucose, L-Glutamine, 110 mg/l Sodium Pyruvate)	Invitrogen
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin Lösung (10,000 u/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	Sigma-Aldrich
Amphotericin B Solution (250 µg/ml)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen
Trypsin-EDTA Solution (10x)	Sigma-Aldrich
Hygromycin B (50 mg/ml)	Sigma-Aldrich
Doxorubicin	Universitätsapotheker Marburg
Tamoxifen (gelöst in Ethanol)	Sigma-Aldrich

### 2.7.2 Antibiotika

Puromycin (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich
Hygromycin	Sigma-Aldrich
Ampicillin (100 mg/ml)	Sigma-Aldrich

### 2.7.3 Medien, Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

#### LB-Medium

5 g/l	Hefeextrakt
5 g/l	NaCl
10 g/l	Trypton

Mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt; durch Autoklavieren sterilisiert

### **LB-Agar**

15% Agar-agar  
85% LB-Medium

### **TAE-Puffer**

40 mM Tris  
0,57 % Essigsäure  
1 mM EDTA

### **Weitere Puffer**

DNY-Ladepuffer V in 60 % Glycerol Applichem  
RLT-Lysepuffer Quiagen  
10x Buffer Orange (Kontrollverdau) Fermentas

### **2.7.4 Agarosegele zur Gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten**

0,5 g Agarose  
50 ml TAE-Puffer  
Aufkochen bis klar  
1 Tr. Ethidiumbromid

### **2.7.5 Medien, Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden**

#### **Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese**

##### **5x Laufpuffer für SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese**

0,5 % SDS  
1,25 M Glycin  
125 mM Tris

##### **10x Blotpuffer für SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese**

1,5 M Glycin  
200 mM Tris

Durch Autoklavieren sterilisiert



**1x Blotpuffer für SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese**

75 ml H<sub>2</sub>O  
10 ml 10x Blotpuffer  
15 ml Methanol

**10x TBS**

1,5 M NaCl  
0,5 M Tris-HCl  
Mit HCl auf pH 7,6 eingestellt

**TBST 0,1**

1x TBS  
0,1 % Tween  
Durch Autoklavieren sterilisiert

**RIPA Lysepuffer**

150 mM NaCl  
50 mM Tris-HCl  
0,1% SDS  
0,5% Natrium-Desoxycholat  
1% Triton X-100  
1 mM EGTA

**SDS Lysepuffer**

50 mM Tris-HCL  
2% SDS

### **Sammelgel für SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese**

3,2 ml ddH<sub>2</sub>O  
1,25 ml 0,5 M Tris-HCL (pH 6,8)  
0,5 ml Acrylamid-Mix (40%)  
12,75 µl APS (30%)  
8 µl TEMED

### **Trenngel 12% für SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese**

4,3 ml H<sub>2</sub>Odest  
2,5 ml 1,5 M Tris-HCL (pH 8,8)  
3 ml Acrylamid-Mix (40%)  
17 µl APS (30%)  
6 µl TEMED

## **2.7.6 Puffer und Lösungen für die Histologie**

### **Carnoy**

10% Eisessig  
30% Chloroform  
60% Ethanol

### **Ziegenserum zum Blocken**

10% Ziegenserum  
90% PBS

### **Zitrat-Puffer**

2,94 g Natriumcitrat  
1 l H<sub>2</sub>Odest

Mit Zitronensäure auf pH 6 eingestellt

**Bakterienstamm (E. coli):**

DH10B

**Zelllinien:**

H1299	humane Bronchialkarzinomzellen, extrahiert aus Lymphknotenmetastase	AG Stiewe
LinX A	Verpackerzellen; zur stabilen retroviralen Transfektion mit Puromycin-Resistenz. Derivat von HEK 293 (humane embryonale Nierenzellen)	AG Stiewe

**Enzyme**

Restriktionsendonukleasen (EcoRI, BglII)	Fermentas
Proteaseinhibitor	Roche
RNase A	AppliChem
GoTaq Polymerase	Promega

**Primer**

Primernamen	Sequenz
RTGAPDH_for 118	AATGGAAATCCCATCACCATCT
RTGAPDH_rev 119	CGCCCCACTTGATTTTGG
RTp21_for 63	TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA
RTp21_rev 64	CCGGCGTTTGGAGTGGTA
hNoxa_qPCR_99_S 3104	GCTGGAAGTCGAGTGTGCTA
hNoxa_qPCR_99_AS 3105	CCTGAGCAGAAGAGTTTGG
E2 1384	ATGGAGGAGCCGCAGTCAGAT
ENTR-p53-R 1080	TCAGTCTGAGTCAGGCCCTTC
exon6_PCR-rev 1067	GCGGCTCATAGGGCACCACC

### 2.7.7 Plasmide

#### Gateway-Vektoren

pENTR EE	RBK199	AG Stiewe
pMSCVhygro	AB25	AG Stiewe
pMSCVhygroEE	Hergestellt im Rahmen dieser Arbeit	AG Stiewe

#### Expressionsplasmide

pBABEpuro-p53-RR(=180R)ER <sup>TM</sup>	RBK262	AG Stiewe
pBABEpuro-p53-RE(=180R,181E)ER <sup>TM</sup>	RBK234	AG Stiewe
pBABEpuro-p53-EL(=181L)ER <sup>TM</sup>	RBK227	AG Stiewe
pBABEpuro-p53-LR(=180L)ER <sup>TM</sup>	RBK219	AG Stiewe
pBABEpuro-p53-ER <sup>TM</sup> (p53Wt)	RBK179	AG Stiewe
pBABEpuro-ER <sup>TM</sup>	RBK247	AG Stiewe

### 2.7.8 Antikörper

#### Primäre Antikörper

Antigen	Name	Typ	Verdünnung	Hersteller
p53	DO-1	Maus monoclonal	1:10 000	Santa Cruz
p21	C19	Rabbit polyclonal	1:200	Santa Cruz
MDM2	SC-965	Mouse monoclonal	1:200	Santa Cruz
NOXA	IMG-3494	Mouse monoclonal	1:1000	Imgenex
cPARP	Asp214	Rabbit polyclonal	1:2000	Cell Signaling
β-Actin	AC-15	Mouse monoclonal	1:5000	Abcam

#### Sekundäre Antikörper

Name	Typ	Verdünnung	Hersteller
Alpha-Mouse HRP	Goat	1:5000	GE Healthcare
Alpha-Rabbit HRP	Goat	1:5000	GE Healthcare
Alexa Fluor 680 Anti Mouse	Goat	1:5000	Invitrogen
Alexa Fluor 680 Anti Rabbit	Goat	1:200	Invitrogen
Alexa Fluor 488 Anti Mouse	Goat	1:5000	Invitrogen
Alexa GaM-546 Anti Mouse	Goat	1:750	Invitrogen

## 3 Methoden

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die adhärennten Zellen wurden in Gewebekulturschalen in Begasungsbrutschränken kultiviert. Die Temperatur in den Inkubatoren betrug 37° C bei einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%. Als Kulturmedium wurde DMEN (Dubecco's Modified Eagle Medium) verwendet, das mit 10% fetalem Kälberserum, 1% Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10 mg/ml) und 0,4% Amphotericin B (250 µg/ml) versetzt wurde.

#### 3.1.2 Passagieren

Die Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz passagiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die adhärennten Zellen wurden mit 5 ml warmem PBS gespült. Hieraufhin wurden sie mit 2,5 ml Trypsin bei 37° C inkubiert; die Ablösung wurde mikroskopisch verifiziert. Nach vollständiger Ablösung wurde das Trypsin durch Zugabe von 7,5 ml Kulturmedium inaktiviert und die Zellen wurden durch Resuspendieren weiter vereinzelt. Nun wurde ein adäquates Volumen der Zellsuspension auf eine neue 15 cm-Schale gegeben, mit frischem Medium auf 20 ml aufgefüllt und gleichmäßig verteilt.

#### 3.1.3 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden so ausgesät, dass sie am Tag des Einfrierens ca. 90% konfluent waren. Sie wurden wie bei der normalen Passagierung mit Trypsin abgelöst und dann in Kulturmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 300g und 4° C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in Medium resuspendiert, das zuvor mit 20% FCS und 10% DMSO versetzt worden war. Diese Suspension wurde in 1 ml-Kryoröhrchen aliquotiert und in einem Behälter, der einen maximalen Temperaturabfall von 1° C/min erlaubt, auf -80° C heruntergekühlt. Am folgenden Tag wurden die eingefrorenen Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **3.1.4 Auftauen von Zellen**

Zum Auftauen der Zellen wurden diese zuerst aus dem flüssigen Stickstoff auf Eis überführt und dann im Wasserbad auf 37° C erwärmt. Nun wurde zu je 1 ml Zellsuspension 10 ml Kulturmedium gegeben und invertiert. Zur Entfernung des DMSO wurde die Suspension bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem Medium aufgenommen, resuspendiert und auf 10 cm-Kulturschalen gegeben, auf denen warmes Kulturmedium vorgelegt worden war. Anschließend wurden die Zellen wie gewohnt kultiviert.

#### **3.1.5 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. In diese wurde 10 µl Zellsuspension gegeben, ein Großquadrant ausgezählt und die Zahl mit 10.000 multipliziert. Das Ergebnis ist die Zellzahl pro ml der Suspension.

#### **3.1.6 Herstellung stabiler Zelllinien durch retrovirale Transduktion**

Zur stabilen Transfektion der Konstrukte in H1299-Zellen wurde zunächst eine transiente Transfektion in LinX-A Zellen (Morgenstern and Land, 1990) vorgenommen. Die auf 6 cm-Schalen ausgesäten, ca. 40% konfluenten Verpackungszellen wurden mit je 5 µg des retroviralen Plasmids transfiziert, als Transfektionsreagenz dienten je 15 µl EscortV. Die Lösung wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf die LinX-Zellen gegeben. Nach 6 Stunden erfolgte der Mediumswechsel.

Nach 48 Stunden wurde der virushaltige Überstand geerntet und mit einem 45 µm Filter filtriert. Zu den 4 ml Überstand wurden 2 ml frisches Medium und 8 µl Polybrene pro ml Medium gegeben. Dies wurde nun auf die am Vortag in 6-well-Platten ausgesäten ( $0,5 \cdot 10^5$  Zellen/Well) H1299-Zellen gegeben. Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 1500 rpm und 37°C zentrifugiert und anschließend über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag erfolgte eine zweite Spin Infection auf gleiche Weise.

Nach Umbettung der Zellen auf 15 cm Kulturschalen erfolgte der Beginn der Selektion 72 Stunden später mit 1,5 µg/ml Puromycin bzw. 200 µg/ml Hygromycin.

### **3.1.7 Ernten von Zellen zur Injektion in Versuchstiere**

Jede Maus hat eine Suspension von  $10^6$  H1299-Zellen in 100 µl PBS intravenös injiziert bekommen. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und erneut in das zur Zellkultur verwendete Medium aufgenommen, um das Trypsin zu inhibieren. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt; anschließend wurde die Dispersion bei 300g für 5 min gefügt und das Pellet in der adäquaten Menge PBS resuspendiert.

## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien**

Zur Herstellung elektrokompenter E. Coli wurde zunächst eine Übernachtskultur angelegt, mit der dann ein 500 ml Kolben mit LB-Medium angeimpft wurde. Dieser wurde bei 37° C auf einem Schüttler (bei 200 rpm) bis zu einer optischen Dichte (OD600) von 0,5 – 0,7 inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde 20 min auf Eis abgekühlt und anschließend 15 min bei 4° C und 400 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 250 ml eiskaltem 10% Glycerol resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dies wurde nochmals mit 250 ml, dann mit 125 ml, 10 ml und 2 ml Glycerol wiederholt. Nach Durchführung einer Probe-Elektroporation wurde die Zellsuspension auf je 50 µl aliquotiert und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80° C.

### **3.2.2 Transformation elektrokompenter E. Coli**

Transformation beschreibt die nicht-virale Übertragung freier DNA in prokaryotische Zellen. Eine Möglichkeit der Transformation ist die Elektroporation,

bei der die Bakterienmembran durch Anlegen eines elektrischen Feldes transient permeabilisiert wird und somit Substanzen (hier DNA) aus dem Außenmedium ins Zellinnere gelangen können.

Die elektrokompenten Bakterien wurden zunächst auf Eis aufgetaut, dann wurde pro 50 µl Zellsuspension 1 µl der zu transformierenden DNA hinzugeben und alles in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Transformation erfolgte durch den Elektroporator MicroPulser von Biorad. Anschließend wurden 500 µl LB-Medium hinzugegeben, der Ansatz wurde in ein Reagenzglas überführt und bei 37° C und 200 rpm 30 min inkubiert. Ein Teil des Ansatzes wurde auf Agar ausgestrichen, das das im Plasmid enthaltene Antibiotikum enthielt, und erneut bei 37° C inkubiert. Aufgrund dieser Selektion konnten nur erfolgreich transformierte Zellen wachsen.

### **3.2.3 Isolation von Plasmid-DNA aus E.coli**

#### **Minipräparation – Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab**

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurden zunächst einige Kolonien der auf Agar wachsenden Bakterienkolonien gepickt und in Flüssigmedium überführt. Es wurden jeweils 5 ml Medium mit einer Kolonie angeimpft, wobei das Flüssigmedium ebenfalls das Selektionsantibiotikum Ampicillin enthielt. Inkubiert wurde bei 37° C und 200 rpm über Nacht.

2 ml dieser Bakterienkultur wurden am nächsten Tag in ein Eppendorfgefäß überführt und das Medium 1 Minute bei 13.000 rpm und 4° C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl Puffer 1 resuspendiert, der RNase enthält. Es wurden 300 µl Puffer 2 hinzugefügt; das hierin enthaltene NaOH sorgt für die Lyse der Zellwand, das SDS denaturiert die Proteine. Durch die Zugabe von Puffer 3 wurde die Lyse gestoppt. Der Ansatz wurde 5 min auf Eis inkubiert und danach 5 min bei 13.000 rpm und 4° C abgefugt. Hiernach befanden sich die Zelltrümmer und die an der Membran hängende genomische DNA im Pellet, die Plasmide und das Zytoplasma gemischt mit dem Puffer im Überstand. Dieser wurde nun – zusammen mit 700 µl Isopropanol – in ein neues Eppendorfgefäß gegeben und der Ansatz gevortext. Das Isopropanol sorgt mit den Salzen und der Säure aus Puffer 3 für die Präzipitation der Plasmid-DNA. Es wurde erneut



für 5 min bei 4° C und 13.000 rpm zentrifugiert, wonach sich Isopropanol und Puffer im Überstand, die ausgefällte Plasmid-DNA gemischt mit den Salzen im Pellet befanden. Um die Plasmid-DNA zu isolieren wurde das Pellet in 500 µl 70% Ethanol resuspendiert und in Folge erneut unter gleichen Bedingungen abgefugt. Nun wurde der Überstand verworfen, das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet, in 5 µl H<sub>2</sub>O dest resuspendiert und unter Schütteln bei 37° C gelöst.

### **Midipräparation – Präparation von Plasmid-DNA in mittlerem Maßstab**

Am Vortag wurde 1 ml der Flüssigkultur der das Plasmid enthaltenden *E. coli* in 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin transferiert und bei 37° C über Nacht inkubiert. Für die Isolation über eine Säule wurde das NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey Nagel) verwendet; es wurde nach Angaben des Hersteller vorgegangen. Am Ende wurde die Plasmid-DNA in 200 µl H<sub>2</sub>O eluiert und bei -20° C gelagert.

#### **3.2.4 Restriktionsanalyse**

Um zu kontrollieren, ob ein entsprechendes DNA-Fragment erfolgreich inseriert wurde, wurde ein Kontrollverdau mit Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Diese schneiden die DNA sequenzspezifisch; über das Vorhandensein bestimmter Fragmentlängen, das elektrophoretisch kontrolliert wurde, ließen sich die DNA-Abschnitte nachweisen. Die Restriktionsanalyse wurde mit folgendem Ansatz durchgeführt:

1 µl        DNA  
1 µl        10fach Puffer  
Je 0,1 µl   der Restriktionsendonukleasen (EcoRI und BglII)  
Ad 10 µl   H<sub>2</sub>Odest

Dies wurde eine Stunde bei 37° C inkubiert die Fragmente danach einer Elektrophorese unterzogen.

### 3.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA wurde der NanoDrop ND-1000 verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Spektralphotometer, das in 1 µl Probe den DNA- bzw. RNA-Gehalt über die Absorption bei 260 nm misst.

### 3.2.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Bei der Elektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wandert die negativ geladene DNA in einem angelegten elektrischen Feld durch ein Agarosegel in Richtung der Anode. Je höher der Agarosegehalt, desto feinporiger das Gel. Kurze DNA-Fragmente können schneller durch das Gel wandern, somit werden die DNA-Fragmente ihrer Länge nach aufgeteilt und lassen sich mit Hilfe eines Längenstandards identifizieren. Dem Gel wird Ethidiumbromid beigesetzt, das in die DNA interkaliert und bei ultraviolettem Licht fluoresziert. Die Fluoreszenzintensität ist hierbei proportional zum DNA-Gehalt. Hierdurch lassen sich die DNA-Banden im Gel identifizieren und bei Zugabe einer Probe mit bekanntem DNA-Gehalt lässt sich zusätzlich die DNA-Menge abschätzen. Zur Herstellung der Agarosegele wurde eine adäquate Menge Agarose (in der Regel 1%) durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst. Anschließend wurde die Lösung zum Abkühlen auf einen Magnetrührer gestellt und eine geringe Menge Ethidiumbromid hinzugefügt. Das noch flüssige Gel wurde in eine Gelkammer mit eingesetztem Kamm zur Aussparung der Probenaschen gegossen und erkalten gelassen.

Nach vollständigem Auspolymerisieren des Gels wurde dieses in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die DNA-Proben wurden mit der entsprechenden Menge Ladepuffer versetzt, damit sie einerseits in die Gelaschen absinken und andererseits die Lauffront der Probe sichtbar gemacht wird. Zusätzlich wurde ein Längenstandard mitgeführt. Nach Auftragung der Proben wurde die entsprechende Spannung (in der Regel 90 mV) angelegt.

### 3.2.7 DNA-Gelextraktion

Die entsprechende DNA-Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) aufgereinigt. Die Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers; am Ende wurde die extrahierte DNA in 50 µl nucleasefreiem Wasser diluiert und bei -20°C gelagert.

### 3.2.8 DNA-Aufreinigung

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde ebenfalls das Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) verwendet. Hierbei wurde die DNA zunächst in einer Affinitätssäule fixiert, während Primer, dNTPs, Enzymrückstände etc. ausgewaschen wurden. Am Ende wurde die DNA ebenfalls in nucleasefreiem Wasser diluiert und bei -20°C gelagert.

### 3.2.9 Isolation von RNA

*Für die qPCR-Analysen wurden die Zellen geerntet und RNA-Extraktion, cDNA-Synthese und in Folge die quantitative Realtime-PCR durchgeführt.*

Die behandelten Zellen wurden mit PBS gewaschen, bevor 600 µl RLT-Lysepuffer pro 6 cm Kulturschale direkt auf die Zellen gegeben wurde. Nach Schwenken und Lösen der Zellen mit Hilfe eines Zellschabers wurde das Lysat bei -80°C gelagert.

Die Isolation der RNA erfolgte mit Hilfe des Quiagen RNeasy Mini Kits am Quiacube nach Anleitung des Herstellers. Die RNA wurde anschließend bei -80°C gelagert.

### 3.2.10 cDNA-Synthese

Um später eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchführen zu können, muss die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Diese reverse Transkription wurde mit dem Omniscript RT Kit (Quiagen) durchgeführt. Hierzu wurden 0,75 µg der umzuschreibenden RNA in 9,6 µl H<sub>2</sub>Odest mit 0,75 µl reverser Transkriptase, 0,15 µl RNase Inhibitor (40 U/µl; Ribolock), 1,5 µl Random-

Hexamer-Primern (10  $\mu$ M) und 1,5  $\mu$ l dNTPs (5 mM) gepuffert inkubiert. Anschließend wurde die cDNA bei -80°C gelagert.

### 3.2.11 Quantitative Realtime-PCR

Die quantitative Realtime-PCR (qPCR) ermöglicht neben der Vervielfältigung zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Hierüber lassen sich – bei der hier nach unterschiedlicher Behandlung gewonnenen cDNA - Rückschlüsse auf die Genexpression der Zelle unter verschiedenen Bedingungen ziehen.

Die quantitative Analyse erfolgt durch Fluoreszenzmessungen in jedem Zyklus. Hierfür wird dem Ansatz ein interkalierender Farbstoff hinzugefügt, dessen Fluoreszenzintensität proportional zum DNA-Gehalt zunimmt. In diesem Fall wurde der Farbstoff SYBR Green verwendet. Alle Analysen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Hierfür wurde folgender Ansatz verwendet:

12,5 $\mu$ l	2 x SYBR Green Mix
0,25 $\mu$ l	ROX
0,5 $\mu$ l	Forward Primer (10 pmol)
0,5 $\mu$ l	Reverse Primer (10 pmol)
10,25 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
1 $\mu$ l	cDNA

Getestet wurde auf die Expression von NOXA und p21, als Kontrolle wurde GAPDH herangezogen. Hierfür wurden folgende Primer verwendet:

GAPDH	118 + 119
p21	63 + 64
NOXA	3104 + 3105

Die qPCR wurde im Real-time PCR Cycloer MX3005P (Stratagene) mit folgendem Programm durchgeführt:

94° C	120 s (Denaturierung)	1 x
94° C	15 s (Denaturierung)	
60° C	20 s (Annealing)	40 x
72° C	20 s (Elongation)	
95° C	60 s (Denaturierung)	
55° C	30 s (Annealing)	1 x
95° C	30 s (Elongation)	

Die Auswertung wurde nach der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode durchgeführt. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Amplifikation des zu untersuchenden Gens mit gleicher Effizienz abläuft wie die des Kontrollgens (GAPDH). Der CT-Wert (Cycle Threshold) beschreibt den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt; hierfür lag ein geeigneter Schwellenwert fest. Der Ct-Wert steht in linearem, umgekehrt proportionalem Zusammenhang mit dem Logarithmus der ursprünglich eingesetzten DNA-Menge.

Zur Berechnung des  $\Delta\Delta Ct$ -Wertes wird zunächst der  $\Delta Ct$ -Wert errechnet; hierfür werden die Ct-Werte des Referenzgens von den Ct-Werten des zu untersuchenden Gens (Zielgen) abgezogen.

$$\Delta Ct = Ct(\text{Zielgen}) - Ct(\text{Referenzgen})$$

Anschließend kann der  $\Delta\Delta Ct$ -Wert berechnet werden, indem die  $\Delta Ct$ -Wert mit dem  $\Delta Ct$ -Wert der Kontrolle verglichen wird:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Zielgen}) - \Delta Ct(\text{Kontrolle})$$

Anschließend wird der Wert in die Gleichung  $n\text{-fache Expression} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  eingesetzt.

### 3.2.12 Präparation von DNA zur Sequenzierung

Die DNA-Extraktion wurde mit Hilfe des PEQLAB Tissue DNA Mini Kits vorgenommen. Zur Lyse wurde den in PBS diluierten Zellen OB-Protease zugesetzt, gevortext und die Suspension 1 Stunde bei 55° C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zur Elimination des Zelldetritus wurde 5 min bei 1000 g zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet. Zu der Lösung wurden die entsprechen-

den Mengen BL-Puffer und Ethanol gegeben, es wurde erneut gevortext und die Mischung wurde auf die Säulen aufgetragen. Nach Zentrifugation bei 8000 g für 1 min wurde der Durchfluss verworfen. Es wurde noch zweimal 1 min bei 8000 g mit Waschpuffer gewaschen und 2 min bei 10000 g trocken zentrifugiert. In Folge wurde 200 µl auf 70° C vorgewärmter Elutionspuffer auf die Säulen gegeben, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert, 1 min bei 5000 g zentrifugiert und mit dem nun die extrahierte DNA enthaltenden Durchfluss eine PCR durchgeführt.

### **3.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.3.1 Herstellung von Zelllysaten**

Die Zellen wurden am Vortag so ausgesät, dass sie am Tag der Ernte ca. 90% konfluent waren. Das Medium wurde abgesaugt und es wurde einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 – 3 ml PBS pro 15 cm-Schale hinzugegeben und die Zellen wurden mit einem Zellschaber in Lösung gebracht. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 4°C und 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in 225 µl RIPA, dem 25 µl Proteaseinhibitor zugesetzt worden waren, resuspendiert. Die Lösung wurde  $\frac{1}{2}$  Stunde auf Eis inkubiert und anschließend sonifiziert, um die Zellen noch besser zu lysieren. Nichtlösliche Zellbestandteile wurden bei 13000 g und 4°C für 10 min abzentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bei -80°C gelagert.

#### **3.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Das Bradford-Reagenz hat sein Absorptionsmaximum in ungebundener Form bei 470 nm; durch Komplexbildung mit Proteinen verschiebt es sich aus dem roten ins blaue Spektrum, auf eine Wellenlänge von 595 nm. Bei der Proteinkonzentrationsbestimmung durch Bradford wird sich dies zu Nutze gemacht: zu 1 µl Probe, diluiert in 800 µl dest. Wasser, werden 200 µl Bradford-Reagenz gegeben und die Extinktion bei 595 nm (blau) gegen die bei 470 nm (rot) gemessen. Die Werte werden mit denen eines Proteinstandards verglichen und

hierdurch kann auf die Proteinkonzentration in der Lösung geschlossen werden. Alle Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

### 3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

Mittels SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese lassen sich Proteine in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach auftrennen.

Hierfür werden die Proteine vorher mit Natriumdodecylsulfat (SDS) auf 95°C erhitzt. SDS ist ein anionisches Reagenz, das mit hoher Affinität an Proteine bindet und durch seine negative Ladung die Eigenladung der Proteine maskiert, was eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht erst möglich macht. Zusätzlich löst es nichtkovalente Bindungen, zerstört also die Primär- und Sekundärstrukturen der Proteine. Hierzu trägt auch das in der Pufferlösung vorhandene  $\beta$ -Mercaptoethanol bei, das Disulfidbrücken zu freien Thiolen reduziert. Die Proteine weisen beim Durchlaufen des Gels nun eine ellipsoide Form auf und sind negativ geladen.

Das Gel besteht aus einem Trenngel- und einem Sammelgelanteil. Im Sammelgel werden die Proben konzentriert, im Trenngel erfolgt die eigentliche Auftrennung. Die Gele bestanden aus Polyacrylamid, Ammoniumpersulfat (APS), Tetramethylethyldiamin (TEMED), Tris-HCL Puffer (pH 6,8 für Sammelgele, pH 8,8 für Trenngele) und destilliertem Wasser. Über den Polyacrylamidgehalt wird die Porengröße der Trenngele geregelt. APS ist Initiator, TEMED Katalysator der Polymerisation.

Zur Herstellung wurde zunächst das Trenngel in die Gelapparatur gegossen und mit Isopropanol überschichtet; nach dessen Auspolymerisation wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel über das Trenngel geschichtet und mit einem Kamm für die Aussparung der Probenaschen gesorgt. Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingebaut, diese mit SDS-Puffer befüllt und die Probenaschen wurden mit der entsprechenden Menge Protein beladen. Zusätzlich wurde ein Längenstandard mitgeführt. Der Geldurchlauf erfolgte im Sammelgel bei 90 V, im Trenngel bei 150 V.

Neben diesen selbst hergestellten Gelen wurden auch Fertiggele, NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris-Gradienten-Gele der Firma Invitrogen, verwendet. Hier bei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Die Trennung erfolgte bei 150 V.

Mit allen Gelen erfolge nach der Auftrennung ein Western Blot.

### 3.3.4 Western Blot

Um die Proteine immunochemisch sichtbar zu machen, müssen sie zunächst auf eine Membran transferiert werden. Dies geschieht mit Hilfe einer senkrecht zum Gel angelegten Spannung, durch die die negativ geladenen Proteine in die Nitrozellulose-Membran wandern und hier durch hydrophobe Wechselwirkungen festgehalten werden. Bei diesem Vorgang bleibt das Auftrennungsmuster aus dem Gel erhalten.

Membran und Trenngel wurden in einer Blotapparatur wie folgt aufeinander geschichtet: Anode – Schwamm – 4 Whatman-Papiere – Nitrozellulosemembran – Gel – 4 Whatman-Papiere – Schwamm – Kathode. Es wurde sichergestellt, dass sich keine Luftblasen im Aufbau befanden. Nun wurde die Blotapparatur mit methanolhaltigem (15%) Puffer gefüllt und es wurde eine Stunde geblottet. Hierbei wurde die Stromstärke so eingestellt, dass die Spannung 100 V nicht überschritt, und die Apparatur an eine Kühleinheit angeschlossen, die eine Temperatur von 10° C sicherstellte.

Die nun die Proteine enthaltende Membran wurde vorsichtig entnommen und zunächst geblockt: um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurden die freien Bindungsstellen durch 10% Milch in TBST 0,1 blockiert. Hierfür wurde die Membran in ein Falcon mit 10 ml Milch überführt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerollert. Anschließend wurde die Milch durch den Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in 5% Milch ersetzt und über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Erstantikörper entfernt, einmalig mit TBST gespült und 3 mal 10 min mit TBST gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper, ebenfalls in 5% Milch, auf die Membran gegeben und diese bei Raumtemperatur eine Stunde auf dem Rollschüttler inkubiert. Hiernach wurde erneut mit TBST gespült und 3 mal 10 min gewaschen.

Durch die Kopplung des Sekundärantikörpers an die Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase), die die Chemolumineszenzreaktion des Luminols katalysiert, ließen sich die immunochemisch markierten Proteine sichtbar machen. Hierfür wurde die Membran mit 300 µl des ECL Western Blotting Sub-



strate von Pierce in einer Kassette inkubiert und dann der in einer Dunkelkammer auf die Kassette gelegte Film nach unterschiedlichen Inkubationszeiten entwickelt. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet; hier wurde ein fluoreszenzgekoppelter Sekundärantikörper benutzt. die Auswertung hiervon erfolgte am Fluoreszenzscanner Odyssey (Licor).

### 3.3.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Caspase 3 führt in der Effektorphase der Apoptose zur Proteolyse. Durchflusszytometrisch haben wir bei H1299-Zellen mit den unterschiedlichen p53-Mutanten nach Behandlung mit Tamoxifen (100 nm), Doxorubicin (0,5  $\mu$ g/ml), der Kombination aus beidem sowie normalem Medium als Negativkontrolle den Anteil an Zellen mit katalytisch aktiver Caspase 3 bestimmt, um den Einfluss der DNA-Bindungs Kooperativität der verschiedenen p53-Mutanten an einem späteren Punkt im Apoptoseprozess zu untersuchen. Hierfür wurden H1299-CLuc-Zellen von Robert Kahnis verwendet mit folgendem Konstrukt: pCMV-neo-p53ER<sup>TAM</sup>-T2A-GLuc.

Für die Messungen wurde das CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase-3 Staining Kit von BioVision benutzt. Die Zellen wurden mit Trypsin gelöst und in Medium resuspendiert, sodass eine Einzelzellsuspension entstand. Laut Herstellerangaben wurde ein Mastermix aus 300  $\mu$ l Medium und 1  $\mu$ l FITC-DEVD-FMK pro Probe hergestellt, in dem die Zellen resuspendiert und eine Stunde bei 37° C inkubiert wurden. Hiernach wurden die Zellen dreifach mit Waschpuffer gewaschen und bis zu Beginn der Messung auf Eis gelagert.

Beim FACS wurden zunächst die Kontrollzellen unbehandelt gemessen. Auf diese wurde ein Gate gelegt, das alle toten Zellen und Trümmer ausgattet. Dieses Gate wurde auf alle anderen Proben angewandt, in diesem Bereich wurden 20.000 Events gemessen. Anschließend wurde in der unbehandelten Kontrollprobe der Bereich der nicht Caspase 3 positiven Zellen festgelegt und dieser auf alle anderen Proben übertragen. Die so angegebenen Prozentzahlen Caspase 3 positiver Zellen wurden ausgewertet.

## 3.4 Mausmethoden

### 3.4.1 C;129S4-Rag2<sup>tm1.1Flv</sup>Il2rg<sup>tm1.1Flv</sup>-Mäuse

Bei Transplantationen kommt es – in nicht immunsupprimierten Organismen – zu Abstoßungsreaktionen, bei denen das dem Organismus eigene Immunsystem das zugeführte Gewebe als fremd erkennt und eliminiert. Es handelt sich hierbei um ein Zusammenspiel der angeborenen und der adaptiven Immunabwehr, wobei der Hauptteil der Reaktion auf das adaptive System entfällt. Bei Transplantatabstoßungen werden die Histokompatibilitäts-Antigene der transplantierten Zellen als fremd erkannt und verschiedene Reaktionen in Gang gesetzt, unter anderem induzieren zytotoxische T-Zellen Apoptose der Fremdzellen und B-Lymphozyten sezernieren Antikörper, die über Komplementaktivierung zur Apoptose führen. Ergänzt wird dies durch die Reaktion des angeborenen Immunsystems, u. a. durch Phagozyten und durch Natürliche Killerzellen, die das Fehlen des körpereigenen MHC-I-Komplexes erkennen und die Zellen eliminieren. Für Transplantationsversuche sind Tiermodelle wichtig, in denen diese natürliche Abstoßungsreaktion bestmöglich unterbunden wird. C;129S4-Rag2<sup>tm1.1Flv</sup>Il2rg<sup>tm1.1Flv</sup>-Mäuse sind homozygot defizient für zwei Gene: das Recombinase Activating Gene 2 (RAG2) und das Interleukin-2-Rezeptor Gamma-Ketten Gen (IL2-RG) (Goldmann et al, 1998).

IL2-RG kodiert einen Teil des Zytokinrezeptorkomplexes, der verschiedenen Interleukinrezeptoren gemein ist, so denen von IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21. Er befindet sich unter anderem auf der Oberfläche blutbildender Zellen im Knochenmark und beeinflusst Wachstum und Reifung von B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen. Bei Knockout beider Allele ist eine normale Reifung von Lymphozyten nicht mehr möglich. Mäuse, die ein homozygotes Knockout von IL2-RG haben, produzieren keine Natürlichen Killerzellen und die Zahl von Lymphozyten im peripheren Blut ist stark erniedrigt. RAG2-defiziente Mäuse produzieren weder B-, noch T-Lymphozyten; hier ist die Synthese der Natürlichen Killerzellen jedoch weitgehend erhalten. Durch Kreuzung dieser beiden Mauslinien entstanden RAG2<sup>-/-</sup>, IL2-RG<sup>-/-</sup> Mäuse, die weder B-, noch T-Lymphozyten, noch Natürliche Killerzellen enthalten. Abstoßungsreaktionen gegen Allo- und Xenotransplantate sind hier stark eingeschränkt, was diese Mäuse für die Injektion fremder Zellen und Transplan-

tationsversuche generell qualifiziert.

### **3.4.2 Generelle Haltungsbedingungen**

Die Mäuse wurden in Macrolonkäfigen Typ II / Typ III auf Espeneinstreu gehalten. Die Käfige wurden einmal wöchentlich gewechselt. Die Temperatur betrug konstant zwischen 20°C und 22°C, bei 50% relativer Luftfeuchtigkeit. Die Tiere unterlagen einem regelmäßigen Tageszyklus (12 h / 12 h). Als Futter wurde Lasvendi ROD 16-R verwendet, zur Zucht Lasvendi ROD 18-R. Im Alter von 21 Tagen wurden die Tiere auseinandergesetzt, zu Versuchsbeginn waren sie 4 bis 6 Wochen alt.

Der gesundheitliche Zustand der Tiere wurde täglich kontrolliert und mit Hilfe von Scoresheets dokumentiert (siehe auch 22).

### **3.4.3 Intravenöse Injektion der H1299-Zellen**

Jede Maus hat eine Suspension von  $10^6$  H1299-Zellen in 100 µl PBS intravenös injiziert bekommen. In den Blutkreislauf injizierte Zellen haben generell im ersten Kapillarbett die höchste Wahrscheinlichkeit anzuwachsen. Bei der intravenösen Injektion ist das erste Kapillarbett die Lunge; da es sich bei H1299 um eine nichtkleinzellige Bronchialkarzinom-Zelllinie handelt, wurde eine pulmonare Metastasierung erwartet.

Die Injektion erfolgte in die Schwanzvene. Hierzu wurden die Tiere zunächst für mindestens 5 min unter Rotlicht gesetzt, um die Vene zu dilatieren. Die zu verabreichende Zellsuspension wurde mehrfach invertiert und luftblasenfrei aufgezo-gen. Anschließend wurden die Mäuse in einen speziell angefertigten Injektionskäfig gesetzt, der Schwanz wurde mit Desinfektionslösung besprüht und die Zellen wurden langsam in das proximale Drittel der Schwanzvene injiziert.

### **3.4.4 Herstellung von Tamoxifen zur intraperitonealen Injektion**

Pro Injektion wurde 1 mg Tamoxifen verabreicht. Damit sie gut von der Tunica Serosa aufgenommen werden können, müssen intraperitoneale Injektionslö-

sungen lipophil sein. Hier wurde als Hauptträgermittel Maisöl verwendet. Die Lösung hatte folgende Zusammensetzung:

100 mg Tamoxifen  
0,5 ml Ethanol  
9,5 ml Maisöl

Tamoxifen und Ethanol wurden durch Resuspendieren gut vermischt. Das Maisöl wurde hinzugefügt und die Suspension im Wasserschallbad mit Eis unter Lichtausschluss behandelt, bis sich die Tamoxifenkristalle vollständig gelöst hatten. Die Lösung wurde aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  höchstens eine Woche gelagert.

### **3.4.5 Intraperitoneale Injektion von Tamoxifen**

Hierfür wurde die Maus wie folgt in der Hand fixiert: zwischen Daumen und Zeigefinger wurde die Maus am Nackenfell gehalten, mit dem kleinen Finger wurde die Schwanzwurzel am Handballen fixiert und mit dem Ringfinger das linke Hinterbein zur Seite gehalten. Nun konnte die ölige Tamoxifenlösung in den linken unteren Quadranten des Abdomens injiziert werden, wobei immer ein Abstand von ca. 1 cm zur Linea Alba gehalten wurde. Hierbei wurde die Maus in leichter Kopftieflage gehalten; dies führt zur kranialen Verlagerung der Organe und senkt die Wahrscheinlichkeit von Organperforationen. Die Tamoxifeninjektion wurde – außer bei den Kontrollmäusen – täglich durchgeführt und einen Tag vor Injektion der Tumorzellen begonnen.

### **3.4.6 Doxorubicin-Behandlung**

Ein Teil der Mäuse bekam am 21. Versuchstag einmalig eine Doxorubicin Chemotherapie. Die Injektionslösung enthielt 1,6 mg Doxorubicin /ml, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung. Pro Maus wurden 100 $\mu\text{l}$  Lösung (160 $\mu\text{g}$  Doxorubicin) injiziert, dies entspricht bei einem durchschnittlichen Gewicht von 20 g pro Maus 8 mg / kg Körpergewicht. Die Verabreichung erfolgte intravenös, analog zu der zuvor beschriebenen Zellinjektion.

### **3.4.7 Kleintier-MRT**

Am 27. Versuchstag erfolgte bei den Mäusen des Vorversuchs die Untersuchung im Kleintier-MRT, Modell ClinScan 70/30 USR der Firma Bruker (7 Tesla), mit der Syngo MR B15 Software der Firma Siemens. Für die Untersuchung wurden die Tiere mit Isofluran inhalationsnarkotisiert und mit einer Wärmebedeckung geschützt. Während der Messung wurden Atmung, EKG und Körpertemperatur kontrolliert.

### **3.4.8 Sektion**

Am 28. Versuchstag (bei Erfüllung der Abbruchkriterien auch schon früher) erfolgte die Sektion der Versuchsmäuse. Die Tiere wurden jeweils mit Ether inhalationsnarkotisch betäubt, bis keine Reaktion auf Schmerzreflexe mehr festzustellen war. Anschließend wurden sie durch zervikale Dislokation getötet. Während der Sektion wurde routinemäßig Lungen-, Leber- und Gesamtgewicht bestimmt und alle Tiere wurden auf makroskopische Veränderungen untersucht. Alle Lungen und Organe mit makroskopischen Abnormalitäten wurden entnommen und in Carnoy fixiert.

### **3.4.9 Präparation der Lungen**

Zur Präparation der Lungen wurde der Thorax mittels bilateraler anteriorer Thorakotomie eröffnet und der vordere Teil des Brustkorbes entfernt. Anschließend wurde das Kiefergelenk luxiert bzw. die Mandibula frakturiert und das Thoraxpaket von der Zunge ausgehend entnommen. Das Herz wurde abgetrennt, die Lunge mit dem thorakalen Teil der Trachea (bis leicht distal der Bifurkation) entnommen und direkt in Carnoy gelegt. Um Fixationsschäden durch Auftrieb zu verhindern, wurden die Lungen mit Hilfe von Filterpapier am Aufsteigen gehindert.

## 3.5 Histologische Methoden

### 3.5.1 Fixierung der Präparate

Direkt nach Entnahme wurden die Lungen einzeln in jeweils 50 ml Carnoy (30 ml Ethanol, 15 ml Chloroform, 5 ml Eisessig) gelegt und dort mindestens 24 Stunden belassen. Zum Entwässern wurden sie in

Isopropanol I	für 2 Stunden
Isopropanol II	für 2 Stunden
Paraffin I	über Nacht
Paraffin II	über Tag
Paraplast	über Nacht

gelegt, wobei die zweite Lösung jeweils reiner ist als die erste. Anschließend wurden sie in Paraffinblöckchen fixiert, mit einem Schlittenmikrotom geschnitten und auf Objektträger gezogen.

### 3.5.2 Entparaffinierung

Vor jeder Färbung müssen die Schnitte entparaffiniert werden. Dies erfolgte mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe.

Rotihistol I	für 5 min
Rotihistol II	für 5 min
Isopropanol	für 5 min
Ethanol 96%	für 3 min
Ethanol 80%	für 3 min
Ethanol 70%	für 3 min
Aqua dest.	für 1-2 min

### 3.5.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämatoxylin bildet natürlicherweise farblose bis beige Kristalle, durch Oxidation entsteht das ockerbraune Hämatein. Durch Zusatz mehrwertiger Kationen entwickelt es die typische blauviolette Färbung. Bei der HE-Färbung

werden als Kathionen Alaune verwendet; Hämalaune sind Komplexe aus Alau-  
nen und Hämatein. Die Schnitte wurden aus dem destillierten Wasser direkt  
in Hämalaun gegeben und hier 3 min belassen. Danach wurden sie unter flie-  
ßendem Wasser 10 Minuten lang gebläut. Gegengefärbt wurde durch Belassen  
der Schnitte in Eosin für 15 Minuten. Hiernach wurden die Schnitte kurz in  
jeweils 80-prozentiges und 90-prozentiges Ethanol getaucht und dann 5 min  
in Isopropanol belassen. Es folgten Xylol I und Xylol II (wobei die zweite Lö-  
sung reiner ist als die erste). Anschließend wurden die Schnitte mit Entellan  
eingedeckt.

#### **3.5.4 Fluoreszenzfärbung p53**

Hierfür wurden die Objektträger aus dem Aqua dest. direkt in 10 mM Citrat-  
Puffer (2,94 g Trinatrium-Citrat pro Liter H<sub>2</sub>Odest., mit Zitronensäure auf  
pH 6 titriert) überführt und dreimal jeweils 5 min in der Mikrowelle gekocht.  
Zwischendurch wurde der teilweise verdampfte Citrat-Puffer mit Aqua dest.  
aufgefüllt. Anschließend wurden die Objektträger in eine neue Küvette mit  
PBS überführt und auf einem Magnetrührer 5 min gewaschen. Dieser Vorgang  
wurde noch zweimal mit frischem PBS wiederholt. Die Präparate wurden in  
10 mg / ml Glycin überführt und 10 min gerührt, anschließend wurde erneut  
dreimal 5 min in PBS gewaschen.

Die Objektträger wurden einzeln aus der Lösung genommen und die Schnitte  
mit einem Fettstift unkringelt; anschließend wurde 45 min mit 10% Ziegense-  
rum geblockt. Hiernach wurde der Erstantikörper (DO-1), in 10% Ziegenserum  
1:1000 verdünnt, über Nacht auf die Präparate gegeben. Diese Inkubation er-  
folgte bei 4°C. Am darauffolgenden Tag wurde wie zuvor beschrieben mit PBS  
gewaschen. Der Zweitantikörper (Alexa 546 Goat-anti-Mouse), in Ziegenserum  
1:750 verdünnt, wurde auf die Schnitte gegeben und diese wurden 1 Stunde  
bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend erfolgte die Kernfärbung nach Höchst: Die Lösung (Hoechst  
33258) wurde in PBS 1:2000 verdünnt und für 5 min bei Raumtemperatur  
auf die Schnitte gegeben. Es wurde erneut dreimal 5 min mit PBS gewaschen  
und anschließend mit Mowiol eingedeckt.

Alle Präparate wurden unter Lichtausschluss bei 4°C gelagert.

### 3.5.5 Auswertung der Histologie

Die Quantifizierung der p53-positiven Zellen und Metastasen wurde am Mikroskop Olympus FSX 100 vorgenommen. Hierzu wurde unter "Immunfluoreszenz" der Stitching-Modus ausgewählt und pro Maus wurden disseminiert fünf je 3,6135 mm<sup>2</sup> große Sichtfenster aufgenommen, die jeweils über 80% mit Lungengewebe ausgefüllt waren. Pro Maus ergab sich damit insgesamt eine gezählte Fläche von 18,0675 mm<sup>2</sup>. Zur Auswahl der Sichtfenster wurde zunächst ein durchlichtmikroskopisches Übersichtsbild in vierfacher Vergrößerung aufgenommen, auf dem keine Tumoren ersichtlich waren. Aus diesem wurden die fünf Sichtfenster ausgewählt und erst nach Einstellung der richtigen Vergrößerung wurde die Fluoreszenz eingeschaltet. Programme, die zufällige Sichtfenster in histologischen Schnitten auswählen, waren in diesem Projekt nicht sinnvoll anwendbar, da die Kontur der Lungen zu unregelmäßig und die Binnenstruktur von gewebefreien Flächen durchsetzt war, sodass sich bei den hiermit gewählten Sichtfenstern zu große gewebefreie Anteile ergeben hätten. Zur Erstellung der Fotos wurde ein 20x Objektiv gewählt und die Belichtungszeit bei der Do-1 Färbung (rote Immunfluoreszenz) wurde zwischen den jeweiligen Mäusen konstant gehalten. Um eine bessere Vergleichbarkeit bei der Auszählung zu gewährleisten, wurden erst alle Präparate einer Behandlungsgruppe fotografiert und im Folgenden gemeinsam ausgewertet. Hierbei wurde sowohl die Zahl der Metastasen, die mindestens eine p53-positive Zelle enthielt, als auch die Anzahl der p53-positiven Zellen pro Metastase bestimmt. Alle histologischen Auswertungen erfolgten verblindet.

## 3.6 Statistische Methoden

Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit Microsoft Office Excel 2007 und GraphPad Prism 5.0 berechnet. Die Kalkulation der p-Werte erfolgte durch GraphPad Prism 5.0 nach Mann-Whitney U beziehungsweise mittels One-way ANOVA mit Post-hoc-Test nach Newman-Keuls. Als statistisch signifikant wurden p-Werte unter 0,05 angesehen. Die Darstellung aller Daten erfolgt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM, engl.: standard error of the mean). Die graphische Darstellung der statistischen Analysen wurde mit der Software GraphPad Prism Version 5.0 (GraphPad Software Inc. - La Jolla, CA, USA) durchgeführt.



## 4 Ergebnisse

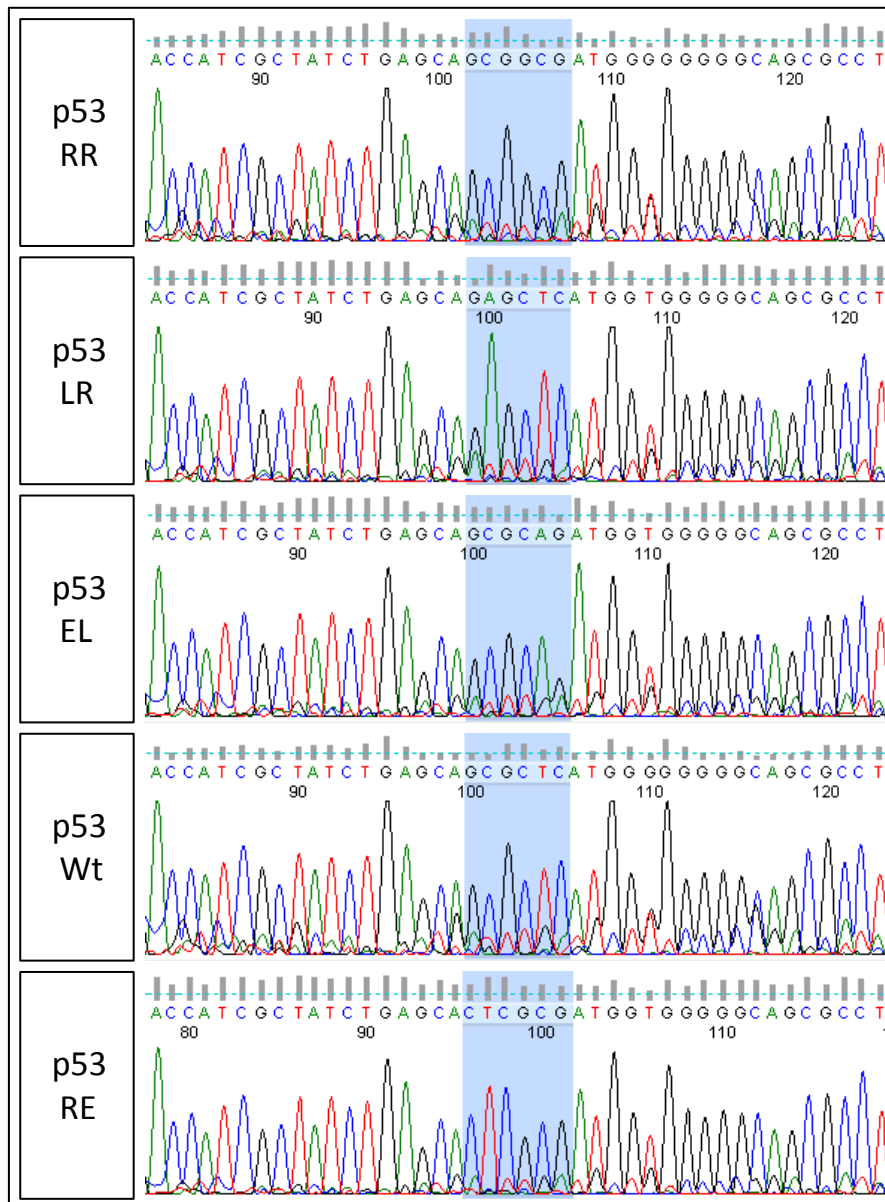
### 4.1 Struktur und Funktionalität der H1-Helix-Mutanten *in vitro*

#### 4.1.1 Die DNA-Sequenzen der p53-Mutanten

Wie einleitend beschrieben, bindet p53 als Tetramer (bestehend aus zwei Dimeren) an die DNA, wobei die Stabilität der Bindung zwischen den einzelnen p53-Molekülen durch Salzbrücken zwischen den konträr geladenen Aminosäuren Glutamat 180 und Arginin 181 vermittelt wird. Ziel war der Austausch dieser Aminosäuren, um die Salzbrücken zu verstärken bzw. abzuschwächen und somit Mutanten unterschiedlicher Kooperativität zu erhalten. Die von der Arbeitsgruppe bereits klonierten p53-Sequenzen wurden mit Hilfe von retroviralen Vektoren mittels Spin Infection stabil in das Genom von zuvor p53-negativen H1299-Zellen integriert; nach Transfektion und antibiotischer Selektion erfolgte die Sequenzierung. Die p53-Mutanten wurden jeweils nach den Buchstabencodes der aus der Mutation resultierenden Aminosäuren benannt. Der Wildtyp von p53, hier abgekürzt als Wt, codiert mit der DNA-Sequenz CTC GCG für die Aminosäuren Glutamat (E) und Arginin (R).

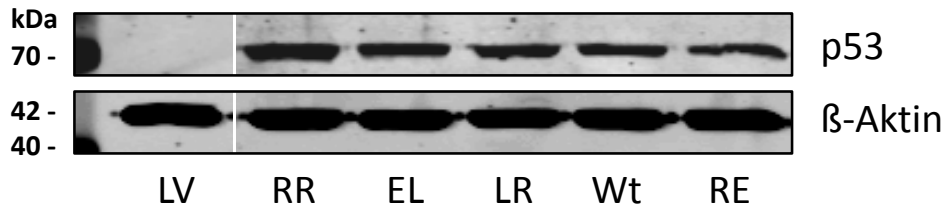
Bei p53-RR ergaben sich beispielsweise an der mutierten DNA-Stelle die Basentriplets GCG und GCG (s. Abb. 6), die zu einer mRNA-Sequenz von CGC CGC transkribiert werden. Triplets mit dieser Sequenz codieren bei der Translation für die Aminosäure Arginin, kurz R, sodass an dieser Stelle zweimal Arginin, also RR, eingebaut wird. Da Arginin positiv geladen ist, das beim Wildtyp an Stelle 180 stehende negativ geladene Glutamat also durch eine invertiert geladene Aminosäure ausgetauscht wurde, ist die Bindungs Kooperativität aufgrund der gestörten Ausbildung der Salzbrücken hier nur sehr schwach.

Nach dem gleichen Schema codieren die DNA-Sequenzen von p53-LR für die Aminosäuren Leucin (L) und Arginin (R) sowie von p53-EL für Glutamat (E) und Leucin (L). Leucin ist eine aliphatische Aminosäure, sodass sich bei diesen Mutanten anstelle der jeweils konträr geladenen Aminosäure eine ungeladene Aminosäure fand. Dies schränkt die Kooperativität ebenfalls ein, wenn auch nicht so stark wie bei RR.



**Abbildung 6: DNA-Sequenzierung der H1-Helix-Mutanten in H1299-Zellen.**

Die Chromatogramme zeigen je einen Ausschnitt der DNA der einzelnen H1-Helix-Mutanten, wobei der mutierte Bereich blau markiert wurde. Die durch Mutagenese generierten H1-Helix-Mutanten von p53 resultieren in einem Austausch der Aminosäuren an Position 180 und 181. Die einzelnen Mutanten wurden nach den nun an diesen Positionen befindlichen Aminosäuren benannt. E: Glutamat. L: Leucin. R: Arginin.



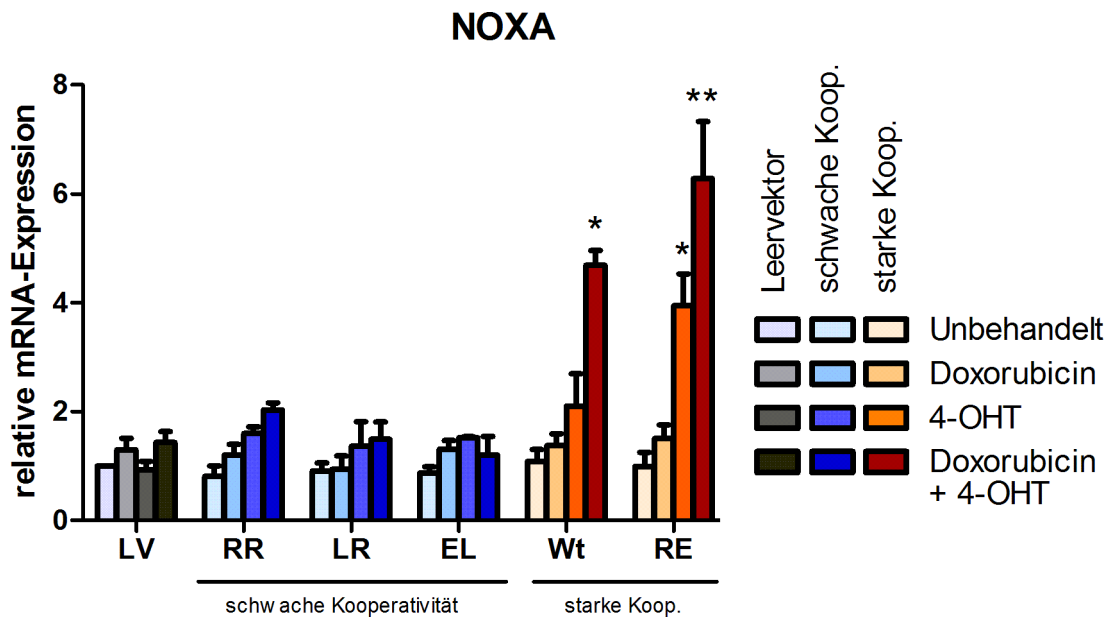
**Abbildung 7: Die verschiedenen p53-Mutanten führen zu quantitativ vergleichbarer Proteinexpression.**

Die DNA der H1-Helix-Mutanten war durch retrovirale Transduktion stabil in das Genom der H1299-Zellen eingebracht worden. Die Ladungskontrolle beim Western Blot erfolgte mit  $\beta$ -Aktin. Die Molekülmasse von 70 kDa kommt durch die Kopplung an das ER<sup>TAM</sup>-System zustande. LV: Leervektor.

Um p53-RE zu erhalten, wurden die beiden Triplets des Wt miteinander vertauscht und Arginin (R) und Glutamat (E) in umgekehrter Reihenfolge translatiert. Somit fanden sich hier an den Positionen 180 und 181 konträr geladene Aminosäuren, die Ausbildung der Salzbrücken war uneingeschränkt und die DNA-Bindungs Kooperativität hierdurch hoch.

#### 4.1.2 Die Proteinexpression der p53-Mutanten in den H1299-Zellen

Die Proteinexpression der stabil retroviral in die H1299-Zellen eingebrachten DNA wurde mittels Western Blot überprüft. Da p53, eingebracht in eine ansonsten p53-negative Tumorzelle, zum schnellen Zelltod führen und eine Kultur der Zellen unmöglich machen würde, wurde es in konstitutiv aktivierbarer Form in das Genom integriert. Hierfür wurde das ER<sup>TAM</sup>-System verwendet: Die p53-Mutanten wurden jeweils an eine transkriptionell inaktive Mutante des Östrogenrezeptors gekoppelt, die nicht auf Östrogen, sondern nur auf den synthetischen Liganden 4-Hydroxytamoxifen reagiert. Hiernach führte die Gabe von 4-Hydroxytamoxifen zur nukleären Translokation und somit zur Aktivierung von p53 (Littlewood et al., 1995). Im Western Blot konnte dargestellt werden, dass die Proteinexpression bei den unterschiedlichen Mutanten quantitativ vergleichbar war (s. Abb. 7), die höhere Molekülmasse von 70 kDa kommt durch die Kopplung an das ER<sup>TAM</sup>-System zustande.



**Abbildung 8: Für die Induktion des proapoptotischen Zielgens Noxa ist hohe Kooperativität essentiell.**

Nach sechsständiger Behandlung der Zellen mit Doxorubicin (0,5 µg/ml), 4-OHT (100 nM), Doxorubicin (0,5 µg/ml) und 4-OHT (100 nM) bzw. ohne Behandlung wurde die mRNA-Induktion von Noxa als proapoptotischem Zielgen von p53 analysiert. Die Balken repräsentieren Mittelwerte±SEM (bezogen auf GAPDH), n=3. \*: p < 0,05, \*\*: p < 0,001 vs. unbehandelt. Koop.: Kooperativität. LV: Leervektor. 4-OHT: 4-Hydroxytamoxifen.

#### 4.1.3 Nur p53-Mutanten hoher Kooperativität sind in der Lage, das pro-apoptotische Gen Noxa zu induzieren

Als nächstes sollten die in die H1299-Zellen eingebrachten p53-Mutanten auf ihre Funktion hin untersucht werden. Analysiert wurde die mRNA-Expression von Noxa, einem Gen der Bcl-2-Familie, das ein Zielgen der p53-vermittelten Apoptose ist und hier als Beispiel für die apoptotischen Funktionen von p53 ausgewählt wurde. Hierfür wurden die Zellen über sechs Stunden entweder mit Doxorubicin (0,5 µg/ml), mit 4-OHT (100 nM) oder mit Doxorubicin und 4-OHT (0,5 µg/ml bzw. 100 nM) behandelt; zudem gab es eine Negativkontrolle ohne Behandlung. Wie bereits erwähnt, induziert 4-OHT in diesem Fall p53, da es zu dessen nukleärer Translokation führt (Littlewood et al., 1995). Doxorubicin ist ein Topoisomerase-II-Hemmer und Interkalans der Stoffgruppe der Anthracycline, das in der Therapie von Lymphomen, Mammakarzinomen,

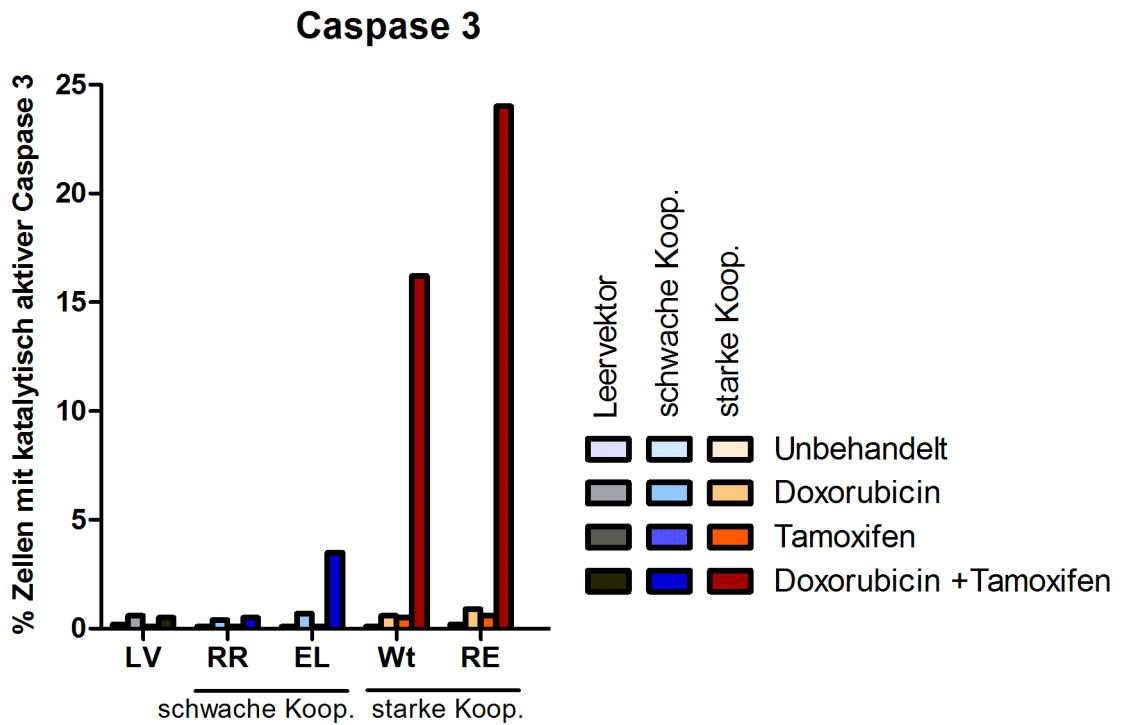
aber auch Bronchialkarzinomen eingesetzt wird. Es führt als Interkalans, durch Hemmung der Topoisomerase II sowie durch Produktion freier Radikale zusätzlich zu DNA-Schäden und damit zu einer Stabilisierung von p53 (Speth et al., 1988). Alle Analysen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Bei der Analyse zeigte sich, dass ausschließlich der Wt sowie die stark kooperative p53-Mutante RE in der Lage waren, die mRNA-Synthese von Noxa zu induzieren (s. Abb. 8). Voraussetzung hierfür war die Behandlung mit 4-OHT oder 4-OHT und Doxorubicin, wohingegen die alleinige Behandlung mit Doxorubicin nicht ausreichte, die Transkription zu induzieren. Die alleinige Induktion von p53 führte beim Wt zu dem 1,9- (n.s.) und bei RE zu dem 4-fachen ( $p < 0,05$ ) mRNA-Spiegel. Unter zusätzlichem zellulärem Stress waren die mRNA-Spiegel von Noxa beim Wt 4,3-fach ( $p < 0,001$ ) und bei RE 6,3-fach ( $p < 0,001$ ) erhöht. Bei den schwach kooperativen Mutanten führte weder die Gabe von 4-OHT, noch die Doxorubicinbehandlung oder die kombinierte Behandlung zu einer signifikanten Induktion der mRNA von Noxa. Somit scheint für die Induktion dieses proapoptotischen Zielgens von p53 eine starke Kooperativität notwendig zu sein.

#### **4.1.4 Für die Induktion von Caspase 3 ist eine hohe DNA-Bindungs-Kooperativität essentiell**

Um den Einfluss der DNA-Bindungs Kooperativität der verschiedenen p53-Mutanten an einem späteren Punkt im Apoptoseprozess zu untersuchen, wurden H1299-Zellen mit den unterschiedlichen Konstrukten behandelt und nach 24 Stunden wurde durchflusszytometrisch der Anteil an Zellen mit katalytisch aktiver Caspase 3 bestimmt. Caspase 3 führt in der Effektorphase der Apoptose zur Proteolyse und wird sowohl beim intrinsischen, als auch beim extrinsischen Weg aktiviert (Nicholson and Thornberry, 1997). Wird eine Zelle hinreichend geschädigt, kann über die apoptotische Wirkung von p53 die Caspase-Kaskade in Gang gesetzt werden, die im Weiteren zur Zellfragmentierung führt und in der Phagozytose des Zelldetritus mündet (Kerr et al., 1972).

Für die durchflusszytometrischen Messungen wurden H1299-Zellen verwendet, die die unterschiedlichen p53-Mutanten ebenfalls in durch 4-OHT induzierbarer Form beinhalteten. Wie für die quantitative Realtime-PCR wurden die Zel-



**Abbildung 9: Für die Induktion von Caspase 3-Aktivität ist hohe Kooperativität essentiell.**

Nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit Doxorubicin (0,5 µg/ml), Tamoxifen (100 nM), Doxorubicin und Tamoxifen (0,5 µg/ml bzw. 100 nM) bzw. ohne Behandlung wurden Zellen mit katalytisch aktiver Caspase 3 FITC-gekoppelt markiert und deren Anteil wurde durchflusszytometrisch gemessen. Ein deutlicher Anstieg zeigte sich bei aktivierten p53-Mutanten starker Kooperativität unter zellulärem Stress. Koop.: Kooperativität. LV: Leervektor. (Daten von J. Charles)

len mit Doxorubicin (0,5 µg/ml), mit 4-OHT (100 nM) oder mit Doxorubicin und 4-OHT (0,5 µg/ml bzw. 100 nM), bzw. mit normalem Medium als Negativkontrolle behandelt. Nach 24 Stunden wurde die katalytisch aktive Caspase 3 in den behandelten Zellen FITC-gekoppelt markiert und die Proben wurden durchflusszytometrisch untersucht.

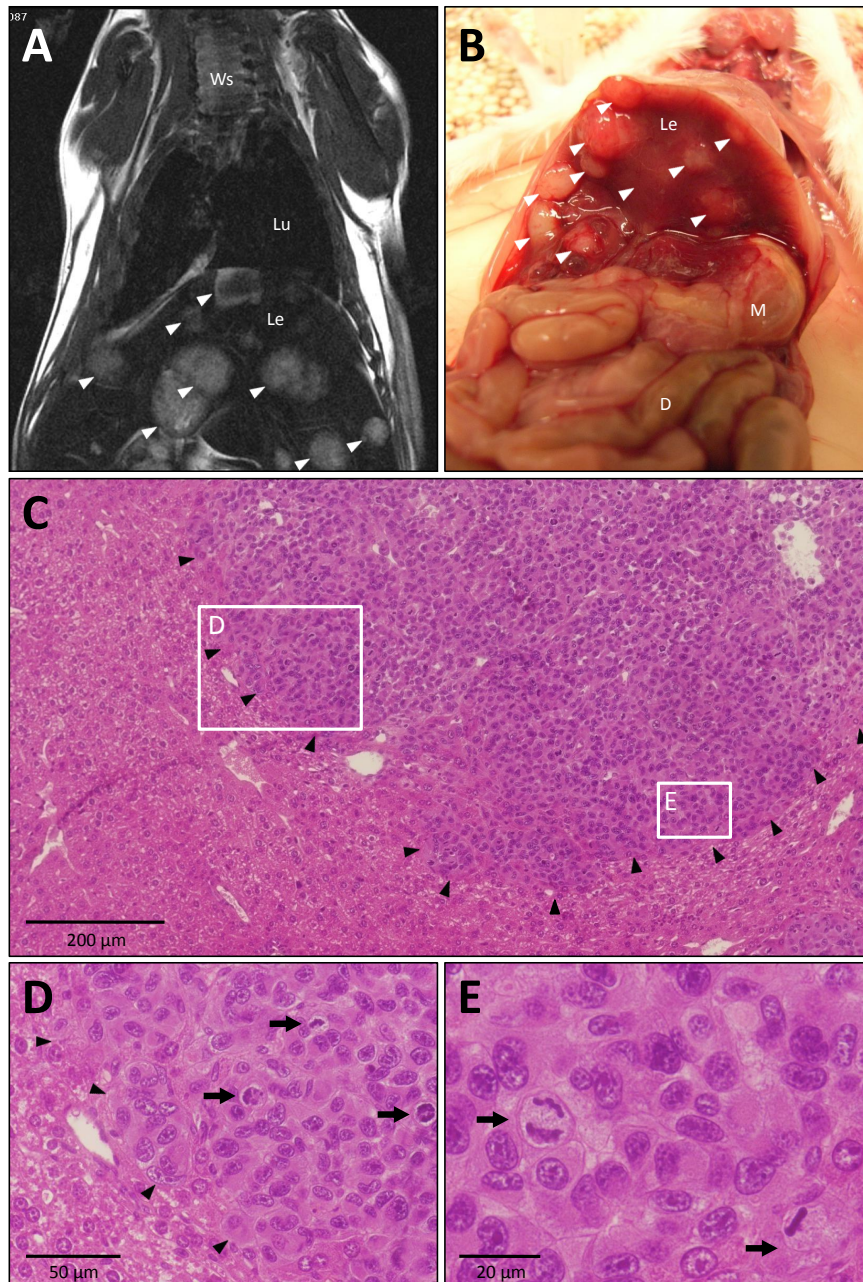
Hierbei zeigte sich, dass der Wt sowie die stark kooperative Mutante RE nach Induktion von p53 in Kombination mit zellulärem Stress mit 16,2 % bzw. 24% Zellen mit katalytisch aktiver Caspase 3 eine deutliche Induktion von Apoptose aufwiesen (s. Abb. 9). Die sehr schwach kooperative Mutante RR unterschied sich bezüglich des Anteils der Zellen mit katalytisch aktiver Caspase 3 mit 0,5 % nicht vom Leervektor (ebenfalls 0,5 %). Bei der schwach kooperativen Mutante EL fanden sich 3,5 % Zellen mit katalytisch aktiver Caspase 3 - hier zeigte sich also im Vergleich zum Wildtyp ein klares Defizit in der Apoptoseinduktion. Deutlich wurde weiterhin, dass weder die alleinige Aktivierung von p53, noch der zelluläre Stress an sich für die Induktion der Caspase-Kaskade ausreichend waren; es fanden sich nur bei der Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin und Tamoxifen deutliche Anstiege der Caspase 3-Aktivität.

Somit scheint die Induktion von Apoptose nur bei hoher Kooperativität in Kombination mit zellulärem Stress hinreichend möglich zu sein.

## 4.2 Intravenös injizierte H1299-Zellen induzieren Tumore in immundefizienten Mäusen

Um sicherzustellen, dass H1299-Zellen Tumore in C;129S4-Rag2<sup>tm1.1Flv</sup>Il2rg<sup>tm1.1Flv</sup>-Mäusen, die aufgrund des Fehlens der Gene für Rag2 und Il2rg einen schweren Immundefekt aufweisen, induzieren, wurden 10<sup>6</sup> parentale H1299-Zellen pro Maus in die Schwanzvene injiziert. Hierbei handelt es sich um ein experimentelles Metastasierungsmodell, das eine Aussaat der Tumorzellen über die Blutbahn imitiert. Aus diesem Grund werden die Raumforderungen im Folgenden auch als Metastasen bezeichnet. Zur Charakterisierung der Raumforderungen erfolgte nach vier behandlungsfreien Wochen zunächst die Bildgebung im MRT und am Tag danach die Obduktion mit konsekutiver Histologie.

Im MRT zeigte sich das Lungenparenchym aller Mäuse homogen ohne Ver-



**Abbildung 10: Intravenös injizierte H1299-Zellen induzieren Tumore in der Leber immundefizienter Mäuse.**

Vier Wochen nach Injektion von  $10^6$  H1299-Zellen in die Schwanzvene ließen sich deutliche Lebermetastasen nachweisen. (A) MRT-Bild: man erkennt in der T1-Gewichtung hyperintense Lebermetastasen (weiße Pfeilspitzen), das Lungenparenchym erscheint in der vorliegenden Auflösung weitgehend homogen. (B) Obduktionsbefund derselben Maus. Makroskopisch lassen sich die Lebermetastasen (weiße Pfeilspitzen) deutlich erkennen. (C) Histologische Übersichtsaufnahme in HE-Färbung. Dargestellt ist ein Lebermetastaserd, umgeben von Leberparenchym. (D,E) Detailaufnahmen aus Abbildung (C). Schwarze Pfeilspitzen: Begrenzung der Metastase. Schwarze Pfeile: Mitosen. Ws: Wirbelsäule. Lu: Lunge. Le: Leber. M: Magen. D: Darm.



schattungen oder Raumforderungen. Bei einigen Mäusen ließen sich jedoch deutliche Leberrundherde nachweisen, die sich in der T1-Gewichtung hyperintens darstellten (s. Abb. 10A).

Bei den Obduktionen am darauffolgenden Tag zeigte sich ein ähnliches Bild: elf von 18 Mäusen zeigten makroskopisch sichtbare Raumforderungen in der Leber (s. Abb. 10B). Diese stellten sich als bis zu 3 mm durchmessende, grau-weiße Leberrundherde hart-elastischer Konsistenz dar, die das Leberparenchym diffus durchsetzten. Die Herdbildungen zeigten sich makroskopisch unbekapselt, aber klar abgrenzbar gegen das umliegende Lebergewebe.

Histologisch bestätigten sich in der HE-Färbung die makroskopischen Beobachtungen: das Leberparenchym war bei einigen Mäusen von zahlreichen Leberrundherden durchsetzt (s. Abb. 10C-E). Diese ließen sich trotz fehlender Umkapselung klar gegen das umliegende Gewebe abgrenzen. Als histologische Kriterien der Malignität zeigten sich eine deutlich erhöhte Kern-Plasma-Ratio sowie Kernpleomorphien; aufgrund der Kernhyperchromasie wirkten die Raumforderungen in der HE-Färbung basophiler als das umliegende Leberparenchym. Zudem fanden sich häufig Mitosen und teilweise waren Kernüberlappungen sichtbar. Nekrosen oder Einblutungen ließen sich nicht erkennen.

Die Lungen präsentierten sich makroskopisch homogen mit teilweise leicht aufgeraut wirkender Oberfläche, jedoch glänzender Serosa. Hier ließen sich makroskopisch keine Raumforderungen erkennen.

Histologisch jedoch zeigten sich zahlreiche Herdbildungen, deren Zellmorphologie derer der Lebermetastasen glich (s. Abb. 11). Besonders deutlich traten dabei die Kernpleomorphien und die erhöhte Kern-Plasma-Ratio hervor. Allgemein lässt sich sagen, dass die in der Lunge gefundenen Metastasen ebenfalls disseminiert aufzufinden waren, jedoch deutlich kleiner und zahlreicher als in der Leber.

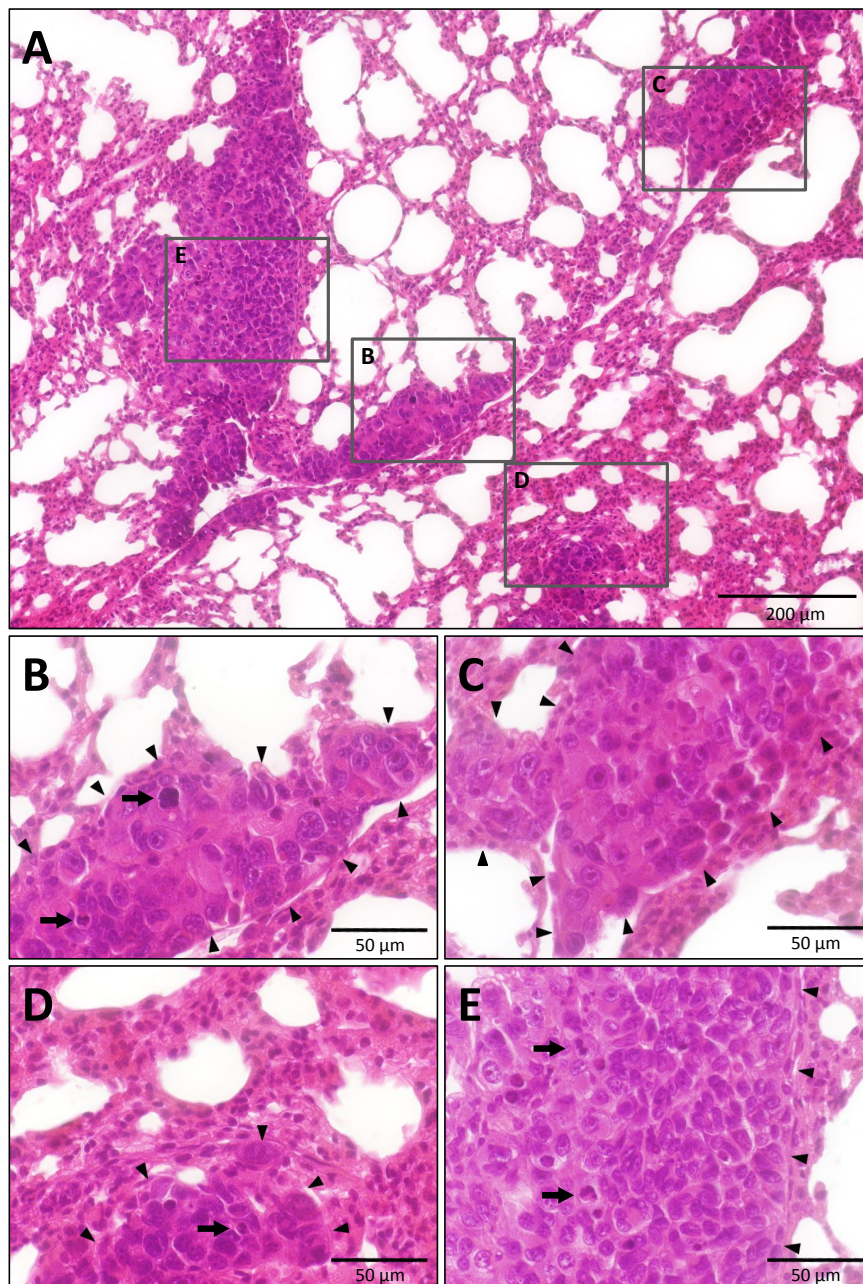
Zur quantitativen Auswertung der induzierten Metastasen wurde in dieser Arbeit die Lunge als zu analysierendes Organ ausgewählt; zunächst, weil die Zellen in die Schwanzvene injiziert worden waren, was eine Metastasierung im ersten Kapillarbett am wahrscheinlichsten macht. Dies ist in der Lunge lokalisiert. Bei den Lebermetastasen bleibt hingegen offen, ob die Zellen erst im zweiten Kapillarbett angewachsen sind, oder ob es sich um Sekundärmetastasen handelt, die von bereits bestehenden Lungenmetastasen abstammen. Fer-

ner handelt es sich bei H1299-Zellen um Zellen eines Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms, genauer eines Adenokarzinoms der Lunge. Diese streuen zwar unter anderem in Leber, Nebenniere und Gehirn, eine Metastasierung in die Lunge ist jedoch am Häufigsten. Methodisch ergab sich bei den Lungenmetastasen darüber hinaus der Vorteil, dass sie kleiner und zahlreicher sowie makroskopisch nicht sichtbar waren. Dies kam der Auswertung zugute, da hierdurch zahlreiche Metastasen innerhalb eines mikroskopischen Sichtfeldes analysiert werden konnten.

### 4.3 Trotz unterschiedlich kooperativer Mutanten finden sich vergleichbar viele Lungenmetastasen

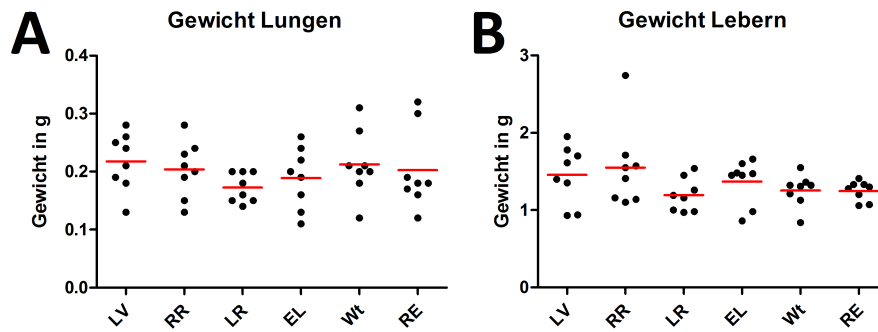
Um herauszufinden, ob bestimmte H1-Helix-Mutanten in der Lage sind, das Tumorstadium im Mausmodell zu unterbinden oder zumindest einzuschränken, wurden H1299-Zellen, in die unterschiedlich kooperative p53-Mutanten durch retrovirale Transfektion eingebracht worden waren, den C;129S4-Rag2<sup>tm1.1Flv</sup>-Il2rg<sup>tm1.1Flv</sup>-Mäusen intravenös in die Schwanzvene injiziert und die Entstehung von Metastasen wurde histologisch quantifiziert. Einen Tag vor Beginn der 28-tägigen Versuchsphase wurde mit der täglichen intraperitonealen Gabe von 4-OHT begonnen, sodass von der ganzzeitlichen Aktivierung der H1-Helix-Mutanten in den Tumorzellen auszugehen war.

Bei der Obduktion wurde serienmäßig das Gewicht von Lunge und Leber erfasst, um eventuelle Gewichtsunterschiede aufgrund stärkerer Metastasierung festhalten zu können (s. Abb. 12). Hierbei zeigten sich sowohl bei den Lungen als auch bei den Lebern keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Durchschnittsgewichtes zwischen den Mäusen mit unterschiedlichen p53-Mutanten in der One-Way-ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-hoc Test. Vielmehr fiel auf, dass herausfallend schwere Lungen und Lebern eher größeren Mäusen zuzuordnen waren. Alle Tiere waren zu Versuchsbeginn zwischen 4 und 6 Wochen alt, dennoch gab es leichte Gewichtunterschiede zwischen den Tieren, die sich teilweise im Organgewicht widerspiegelten. Die Stärke der DNA-Bindungs Kooperativität hatte hier keinen signifikanten Einfluss auf das Gewicht der Lungen und Lebern.



**Abbildung 11: Intravenös injizierte H1299-Zellen induzieren Tumore in der Lunge immundefizienter Mäuse.**

Den Mäusen wurden jeweils  $10^6$  H1299-Zellen intravenös in die Schwanzvene injiziert. Nach vier Wochen zeigten sich zahlreiche, disseminierte Lungenherde. (A) Histologische Übersichtsaufnahme. Man erkennt zahlreiche, disseminierte Metastasen, wobei die Zellmorphologie derer der Lebermetastasen ähnelt. (B-E) Detailaufnahmen aus Abbildung (A). Pfeilspitzen: Begrenzung der Lungenherde. Pfeile: Mitosen.

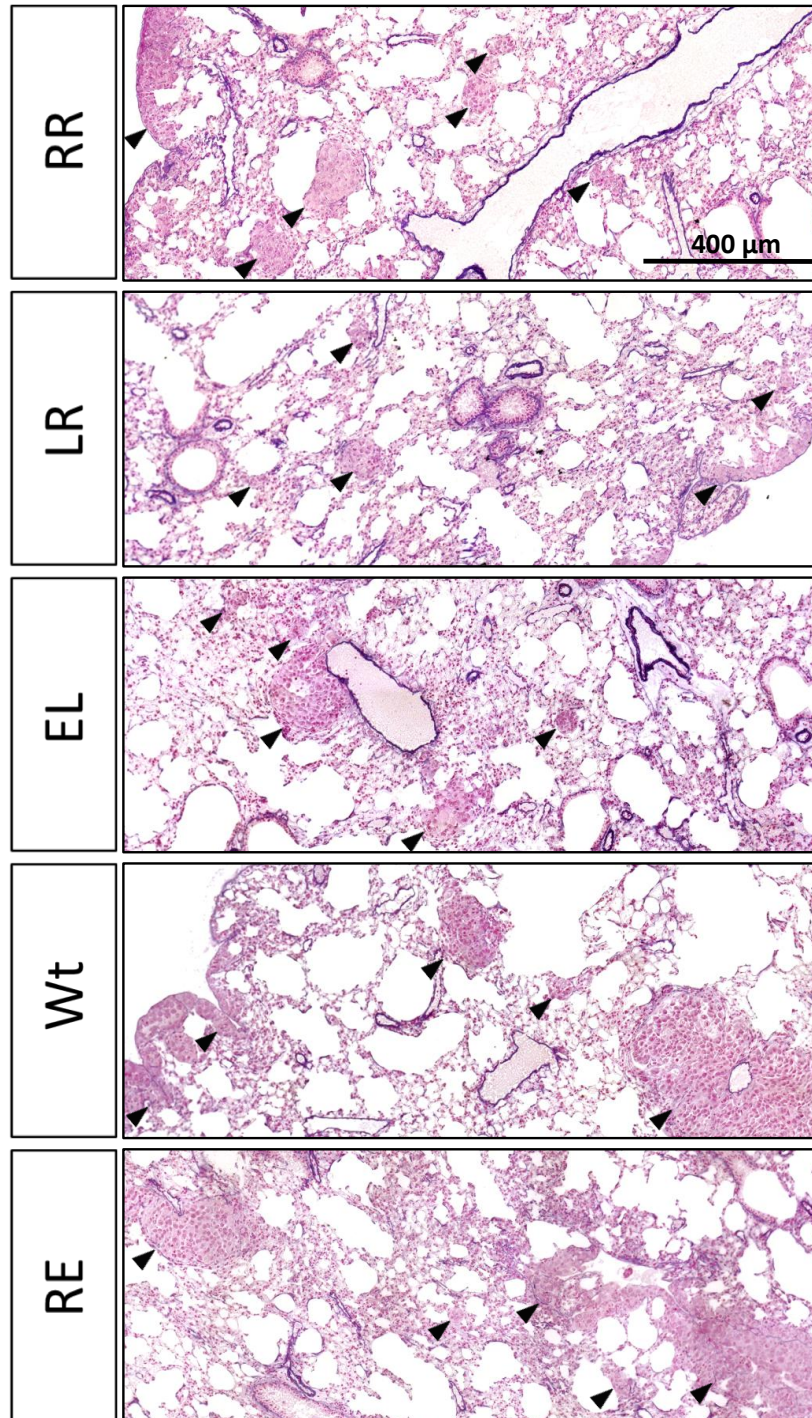


**Abbildung 12: Die DNA-Bindungs Kooperativität hat keinen Einfluss auf das Gewicht der Lebern und Lungen der behandelten Mäuse.**

(A) Gewicht der Lungen 4 Wochen nach Injektion der H1299 und kontinuierlicher Tamoxifenbehandlung, (B) Gewicht der Lebern derselben Mäuse. Aufgetragen ist jeweils das Organengewicht, gruppiert nach Kooperativitätsstärke der H1-Helix-Mutanten. Jeder Punkt markiert ein Einzelorgan, das mittlere Organengewicht jeder Gruppe ist als rote Linie dargestellt. Bezüglich des Durchschnittsgewichtes der Organe zeigten sich zwischen keinen Gruppen signifikante Unterschiede in der One-Way-ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-hoc Test. LV: Leervektor.

Histologisch zeigten sich in den Lungen aller Mäuse in der HE-Färbung zahlreiche, disseminierte Raumforderungen, die klar als Metastasen der intravenös injizierten H1299-Zellen zu identifizieren waren. Die Zellmorphologie entsprach den zuvor beschriebenen Herdbildungen in den Lungen der Mäuse, die parentale H1299-Zellen injiziert bekommen hatten (s. Abb. 11), wobei es zu diesen keine bedeutenden Unterschiede in Tumoranzahl und Tumorgröße gab. Auch die unterschiedlichen H1-Helix-Mutanten hatten, analog zu der Makroskopie, keinen Einfluss auf das Ausmaß der Metastasierung und das darauffolgende Tumorwachstum. Abbildung 13 zeigt repräsentative Ausschnitte aus dem Lungengewebe von Mäusen, die Zellen mit den unterschiedlichen Konstrukten injiziert bekommen hatten; in der Elastika-Färbung lassen sich die Raumforderungen, die im Gegensatz zu gesundem Lungengewebe frei von elastischen Fasern sind, besonders deutlich abgrenzen.





**Abbildung 13: Vergleichbare Anzahl und Größe der Metastasen im Lungengewebe bei Mäusen mit unterschiedlichen H1-Helix-Mutanten.**

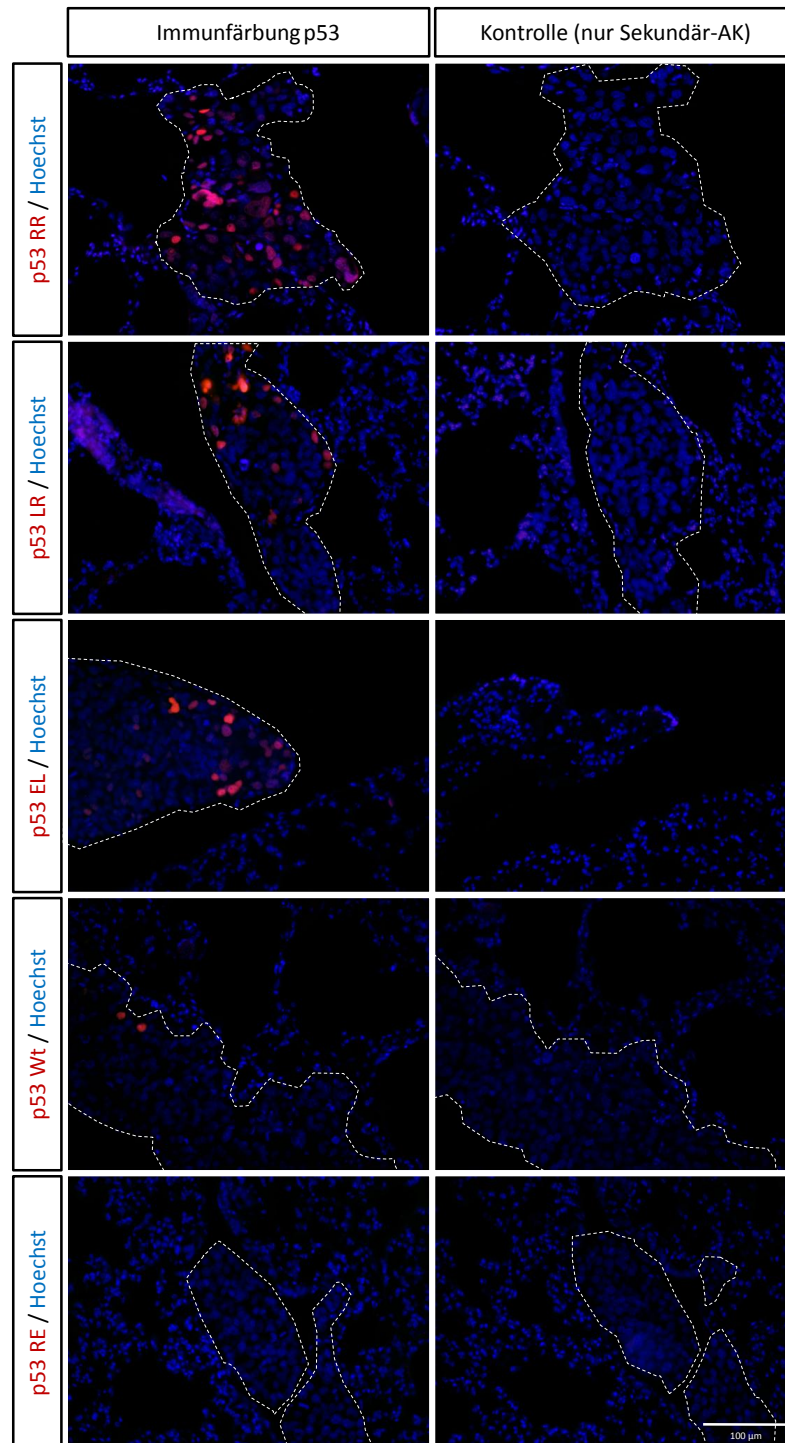
Histologische Analyse der Lungen nach vierwöchiger Behandlung mit Tamoxifen. Die schwarzen Pfeilspitzen markieren Einzelmetastasen. Elastika-Färbung.

#### 4.4 Die Stärke der DNA-Bindungs-Kooperativität korreliert invers mit der Anzahl der p53-positiven Metastasen und Zellen in den Lungentumoren

Da gezeigt wurde, dass die DNA-Bindungs-Kooperativität mit dem Ausmaß der induzierten Apoptose korreliert (Schlereth et al., 2010a), sich aber bei H1-Helix-Mutanten unterschiedlicher Kooperativität eine vergleichbare Anzahl an Metastasen zeigte, wurde in Betracht gezogen, dass in einem Teil der Zellen die stabil retroviral transduzierte DNA nicht mehr transkribiert wurde. Um dies zu überprüfen, wurde p53 immunhistochemisch angefärbt und die zuvor gezeigten Lungenschnitte wurden fluorezenzmikroskopisch untersucht.

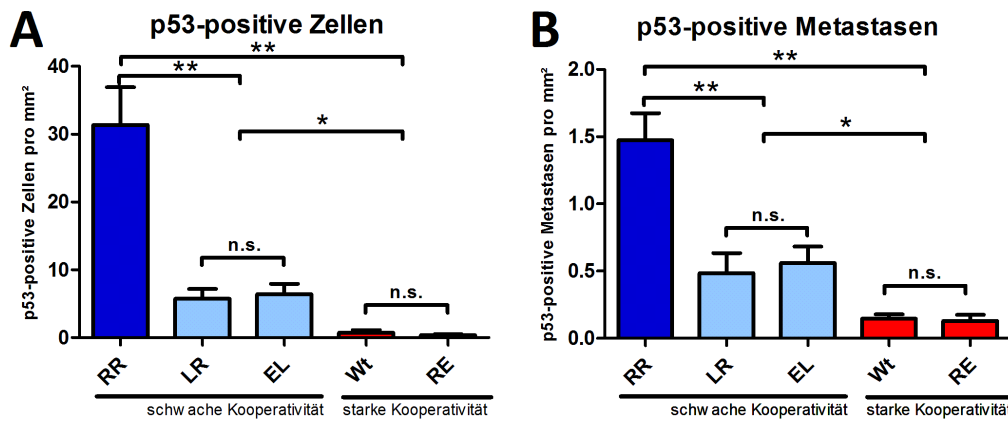
Hierbei zeigte sich zunächst, dass in den meisten Tumoren keine Fluoreszenz nachzuweisen war. Bei den Metastasen, die fluoreszente (p53-positiv) Zellen enthielten, fiel auf, dass diese nur einen geringen Anteil der Gesamtzellmasse der jeweiligen Metastase ausmachten (s. Abb. 14). Um dies genau zu quantifizieren, wurde sowohl die Anzahl der Metastasen, die mindestens eine p53-positiv Zelle enthielten, als auch die Anzahl der p53-positiven Zellen innerhalb dieser Metastasen ermittelt.

Abbildung 15 stellt die Quantifizierung der p53-positiven Zellen und Metastasen von Mäusen dar, die über die gesamte Versuchsphase 4-OHT erhalten hatten, bei denen also die transfizierten H1-Helix-Mutanten über den kompletten Zeitraum nukleär lokalisiert waren. Bei Mäusen, deren Zellen das sehr schwach kooperative Konstrukt RR enthielten, fanden sich im Schnitt  $31,35 \pm 5,56$  p53-positiv Zellen pro ausgewertetem Quadratmillimeter; dies ist hochsignifikant höher als die Gesamtzellzahlen bei allen anderen Konstrukten (jeweils  $p < 0,001$ ). LR und EL bildeten eine schwach kooperative Gruppe, innerhalb derer sich weder die Zahl p53-positiver Zellen, noch p53-positiver Metastasen noch die Größe dieser Metastasen signifikant unterschied ( $5,76 \pm 1,44$  Zellen/mm<sup>2</sup> LR bzw.  $6,41 \pm 1,55$  Zellen/mm<sup>2</sup> EL). Auch der Wt und RE als stark kooperative p53-Mutante grenzten sich gegeneinander nicht signifikant ab, wobei RE tendenziell weniger p53-positiv Zellen aufwies ( $0,39 \pm 0,13$  Zellen/mm<sup>2</sup> RE vs.  $0,74 \pm 0,39$  Zellen/mm<sup>2</sup> Wt). Sowohl der Wt als auch RE zeigten signifikant weniger p53-positiv Zellen als die schwach kooperativen Mutanten LR und EL (jeweils  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 14: Die Stärke der DNA-Bindungs Kooperativität korreliert invers mit der Anzahl der p53-positiven Zellen in den Lungentumoren.**

Immunfluoreszenz der Lungen vier Wochen nach Injektion der H1299 und unter kontinuierlicher Gabe von Tamoxifen. Rot: p53 (Do-1). Blau: Zellkerne (nach Hoechst). Die gestrichelten Linien heben die Tumorbegrenzungen hervor.



**Abbildung 15: Eine starke DNA-Bindungs Kooperativität führt zu einer Reduktion an p53-positiven Zellen und Metastasen.**

Zahl p53-positiver Zellen (A) und Metastasen (B) von Mäusen, die über 28 Tage täglich Tamoxifen erhalten haben. Die Gruppen mit den sehr schwach (RR, blau), schwach (LR und EL, hellblau) und stark (Wt und RE, rot) kooperativen p53-Konstrukten zeigen jeweils signifikante Unterschiede zueinander bezüglich der Zahl p53-positiver Zellen und Metastasen pro mm<sup>2</sup>. Gezeigt sind Mittelwert und SEM. Statistische Auswertung: One-way ANOVA mit Post-hoc-Test nach Newman-Keuls. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ , n. s.: nicht signifikant.  $n = 8$  pro p53-Konstrukt.

In der Auswertung der p53-positiven Metastasen zeigten sich die Daten vergleichbar: mit  $1,47 \pm 0,20$  Metastasen/mm<sup>2</sup> fanden sich bei RR signifikant mehr p53-positive Tumore als bei den anderen beiden schwach kooperativen Mutanten LR und EL ( $0,48 \pm 0,15$  Metastasen/mm<sup>2</sup> bzw.  $0,56 \pm 0,12$  Metastasen/mm<sup>2</sup>, jeweils  $p < 0,05$ ) sowie als bei den stark kooperativen Mutanten Wt und RE ( $0,16 \pm 0,03$  Metastasen/mm<sup>2</sup> bzw.  $0,13 \pm 0,04$  Metastasen/mm<sup>2</sup>, jeweils  $p < 0,001$ ). Des Weiteren zeigten LR und EL eine signifikant höhere Anzahl an p53-positiven Metastasen als Wt und RE ( $p < 0,05$ ).

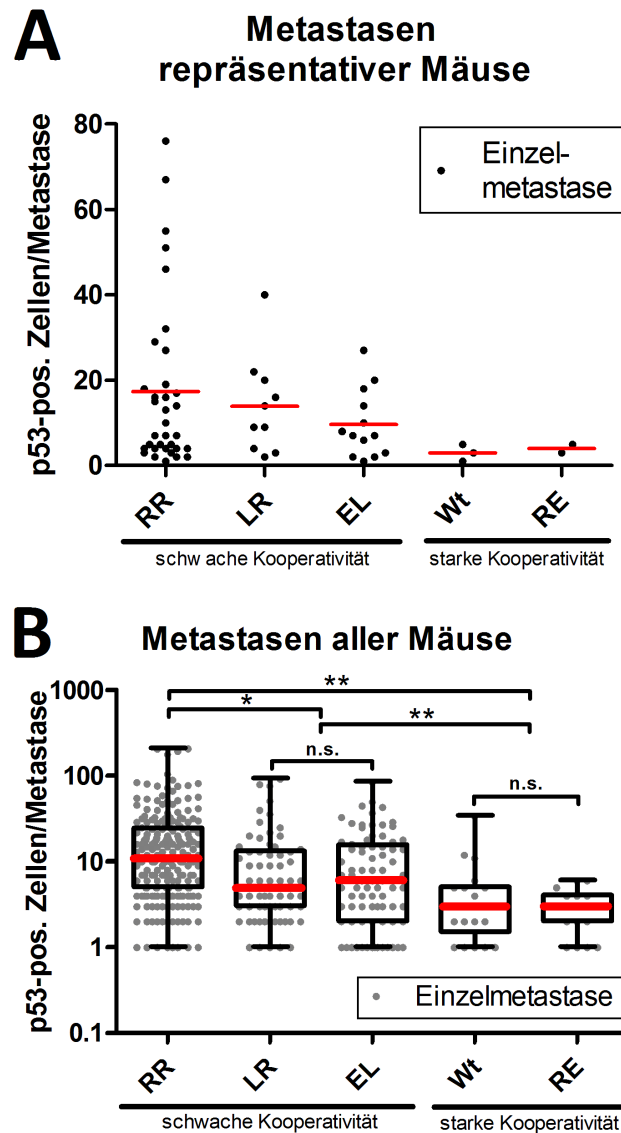
Zusammenfassend lassen sich drei Gruppen einteilen: RR als sehr schwach kooperativer H1-Helix-Mutant mit vielen p53-positiven Zellen und Metastasen, LR und EL als schwach kooperative Mutanten mit mäßig vielen und Wt und RE als stark kooperative Mutanten mit sehr wenig p53-positiven Zellen und Metastasen.

Um die Metastasen näher zu charakterisieren, wurde in Abbildung 16A eine repräsentative Maus pro Kooperativitätsmutante dargestellt. Die Anzahl der Punkte stellt die Metastasenzahl dar, die Höhe des Einzelnen Punktes



auf der Y-Achse gibt die Anzahl p53-positiver Zellen dieser Metastase wieder. Hierbei ist zu erkennen, dass die Mäuse, deren injizierte H1299-Zellen H1-Helix-Mutanten schwacher Kooperativität enthielten, sowohl die meisten p53-positive Metastasen, als auch die höchste Anzahl an p53-positiven Zellen pro Metastase aufwiesen. So fanden sich innerhalb der ausgewerteten Fläche bei der RR-Maus 34 Metastasen, von denen die größte aus 76 p53-positiven Zellen bestand. Im Kontrast hierzu fanden sich bei der RE-Maus auf der gleichen Fläche nur acht p53-positive Zellen, die auf zwei Metastasen verteilt waren. LR und EL unterschieden sich bezüglich der Zahl p53-positiver Zellen kaum: bei LR fanden sich insgesamt 139 p53-positive Zellen, die auf zehn Metastasen verteilt waren, bei EL zeigten sich 132 p53-positive Zellen, verteilt auf 13 Metastasen. Auch bei Wt und RE, die beide sehr wenig p53-positive Zellen und Metastasen zeigten, ließen sich keine deutlichen Unterschiede zueinander ausmachen: beim Wt fand sich eine Metastase mehr als bei RE, die aus nur einer Zelle bestand. Es lassen sich also wieder drei Gruppen voneinander abgrenzen: die Maus, deren injizierte Zellen das sehr schwach kooperative Konstrukt RR enthielten, entwickelte zahlreiche p53-positive Tumore mit sehr vielen p53-positiven Zellen. Im Mittelfeld fanden sich die Mäuse mit den schwach kooperativen Konstrukten LR und EL, die sich in der Gesamtzahl p53-positiver Zellen stark ähnelten. Mäuse, deren Zellen den Wildtyp oder RE (starke Bindungs-kooperativität) erhielten, zeigten nur sehr wenig und sehr zellarme p53-positive Metastasen.

In der Auswertung der Metastasen aller mit Tamoxifen behandelten Mäuse (Abb. 16B) erkennt man im Boxplot die gleiche Tendenz wie bei den repräsentativen Einzelmäusen: eine deutlich höhere mediane Zahl p53-positiver Zellen der Metastasen bei RR (11 Zellen/Metastase) im Gegensatz zu LR und EL (5 bzw. 6 Zellen/Metastase) und dem Wt und RE (jeweils 3 Zellen/Metastase). Die Zellzahlen bei RR zeigten sich hochsignifikant höher als bei allen anderen Gruppen (jeweils  $p < 0.0001$ ); bei LR und EL fanden sich signifikant mehr p53-positive Zellen pro Metastase als beim Wildtyp und bei RE (jeweils  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 16: Die DNA-Bindungs Kooperativität korreliert invers mit Anzahl und Gehalt p53-positiver Zellen der in der Lunge gefundenen p53-positiven Tumore.**

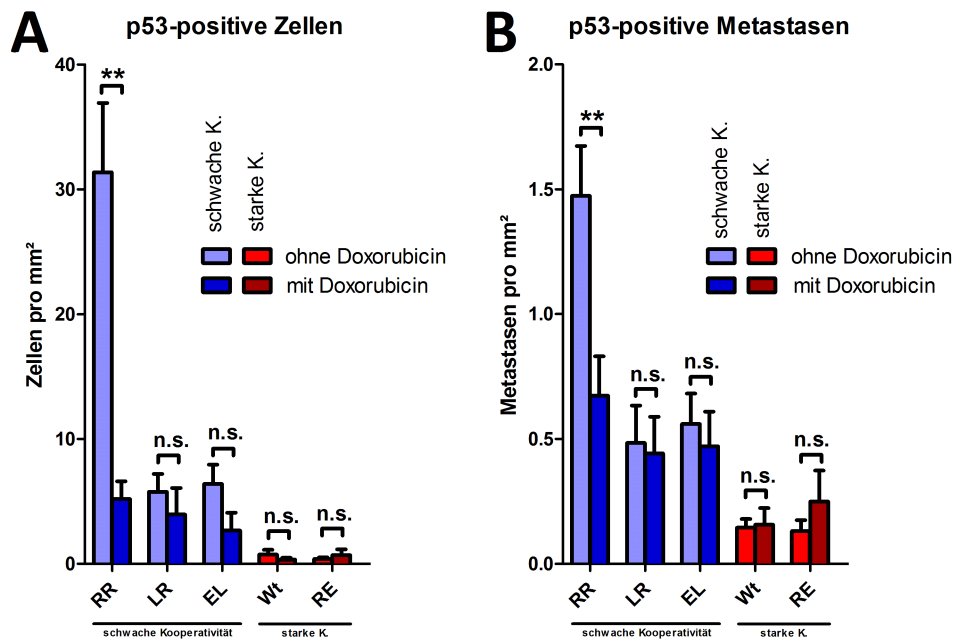
(A) Aufgetragen sind alle untersuchten Metastasen jeweils einer repräsentativen Maus pro injiziertem Konstrukt. Jeder Punkt stellt eine Metastase dar, die Höhe des Punktes auf der Y-Achse gibt die Anzahl p53-positiver Zellen dieser Metastase wieder. Die rote Linie markiert in den Mittelwert des Gehaltes p53-positiver Zellen pro Metastase. (B) Metastasen aller mit Tamoxifen behandelten Mäuse. Die Box hebt den Bereich der 25. bis 75. Perzentile hervor, die rote Linie markiert den Median der Anzahl p53-positiver Zellen pro Metastase. Die Zahl p53-positiver Zellen pro Metastase korreliert invers mit der DNA-Bindungs Kooperativität, wobei sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit den sehr schwach (RR), schwach (LR und EL) und stark (Wt und RE) kooperativen p53-Konstrukten zeigen. Statistische Auswertung: One-way ANOVA mit Post-hoc-Test nach Newman-Keuls. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ , n. s.: nicht signifikant.

#### 4.5 Eine Stabilisierung von p53 durch Doxorubicin zusätzlich zur Aktivierung durch Tamoxifen hat nur bei niedriger Kooperativität signifikante zytoreduktive Effekte

p53 ist als Zielstruktur für neue Medikamente überaus interessant - durch Modifikation der Kooperativität könnte die Effizienz herkömmlicher Therapien gesteigert werden, was einen besseren Therapieerfolg ermöglichen oder eventuell niedrigere Dosen toxischer Zytostatika erlauben würde. Um die Kombination einer chemotherapeutischen Behandlung mit unterschiedlich stark kooperativen p53-Mutanten zu untersuchen, wurde eine Gruppe von Mäusen einer Kombinationstherapie aus 4-OHT und Doxorubicin unterzogen. Doxorubicin wurde den Mäusen, wie auch bei der Chemotherapie von Krebspatienten üblich, intravenös verabreicht, und zwar als Einzeldosis eine Woche vor der Obduktion.

Bei der anschließenden Quantifizierung der Immunfluoreszenz zeigte sich, dass die in den Lungen der Mäuse gefundenen p53-positiven Zellen unter Doxorubicin-Therapie nur bei den Mäusen, deren Zellen das sehr schwach kooperative Konstrukt RR enthielten, signifikant niedriger waren als ohne Doxorubicinapplikation ( $31,35 \pm 5,56$  Zellen/mm<sup>2</sup> ohne vs.  $5,19 \pm 1,43$  Zellen/mm<sup>2</sup> mit Doxorubicin,  $p < 0,05$ ) (s. Abb. 17A). Bei den schwach kooperativen Mutanten LR und EL zeigte sich eine nichtsignifikante Reduktion der Zellzahl (LR:  $5,76 \pm 1,44$  Zellen/mm<sup>2</sup> vs.  $3,95 \pm 2,12$  Zellen/mm<sup>2</sup>, EL:  $6,41 \pm 1,55$  Zellen/mm<sup>2</sup> vs.  $2,67 \pm 1,42$  Zellen/mm<sup>2</sup>). Bezüglich des Wt und der stark kooperativen p53-Mutante RE ließ sich kein Therapieprofit der Doxorubicinbehandlung im Sinne einer reduzierten Zahl p53-positiver Zellen ausmachen: beim Wt sanken die ohnehin niedrigen Zellzahlen nur sehr wenig und nicht signifikant ( $0,74 \pm 0,39$  Zellen/mm<sup>2</sup> vs.  $0,34 \pm 0,14$  Zellen/mm<sup>2</sup>), bei RE fand sich sogar eine leichte, nicht signifikante Steigerung der Zahl p53-positiver Zellen ( $0,39 \pm 0,13$  Zellen/mm<sup>2</sup> vs.  $0,70 \pm 0,46$  Zellen/mm<sup>2</sup>).

Die quantifizierende Analyse der Metastasen unter Doxorubicinbehandlung (s. Abb. 17B) zeigte ähnliche Werte: auch hier waren die Mäuse mit dem am schwächsten kooperativen Konstrukt RR die einzigen, bei denen die Zahl der p53-positiven Metastasen im Vergleich zur alleinigen 4-OHT-Behandlung signifikant erniedrigt war ( $1,47 \pm 0,20$  Metastasen/mm<sup>2</sup> vs.  $0,67 \pm 0,17$  Meta-



**Abbildung 17: Die Behandlung mit Doxorubicin zusätzlich zu Tamoxifen hat nur bei niedriger Kooperativität signifikante tumorreduktive Effekte.**

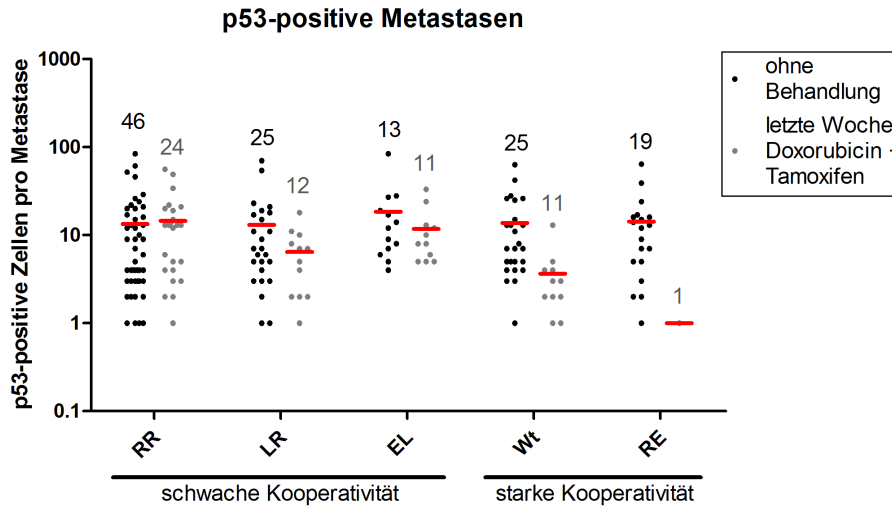
Anzahl p53-positiver Zellen (A) und Metastasen (B) nach vierwöchiger Therapie mit Tamoxifen mit ( $n = 6$ ) und ohne ( $n = 8$ ) zusätzliche Doxorubicintherapie. Gezeigt sind Mittelwert und SEM. Statistische Auswertung: One-way ANOVA mit Post-hoc-Test nach Newman-Keuls. \*\*  $p < 0,001$ , n. s.: nicht signifikant. K.: Kooperativität.

stasen/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ ). Bei LR und EL zeigten sich keine signifikant erniedrigten Metastasenzahlen nach Doxorubicinbehandlung (LR:  $0,48 \pm 0,15$  Metastasen/mm<sup>2</sup> vs.  $0,44 \pm 0,15$  Metastasen/mm<sup>2</sup>, EL:  $0,56 \pm 0,12$  Metastasen/mm<sup>2</sup> vs.  $0,47 \pm 0,14$  Metastasen/mm<sup>2</sup>) und auch beim Wt und bei RE unterschied sich die Zahl der Metastasen mit und ohne Doxorubicinbehandlung nur unwesentlich (Wt:  $0,15 \pm 0,04$  Metastasen/mm<sup>2</sup> vs.  $0,16 \pm 0,07$  Metastasen/mm<sup>2</sup>, RE:  $0,13 \pm 0,04$  Metastasen/mm<sup>2</sup> vs.  $0,25 \pm 0,12$  Metastasen/mm<sup>2</sup>).

Dies zeigt, dass nur die Mäuse, deren Zellen die sehr schwach kooperative p53-Mutante RR enthielten, von der Chemotherapie mit Doxorubicin profitierten: hier sank sowohl die Anzahl der p53-positiven Zellen, als auch die Zahl der p53-positiven Metastasen signifikant ab. Bei allen anderen p53-Mutanten schwacher und starker Kooperativität ließ sich durch die chemotherapeutische Behandlung kein zusätzlicher signifikanter zytoreduktiver Effekt erzielen.

#### **4.6 p53-reaktivierende Therapie reduziert p53-positive Zellen und Metastasen bei bereits bestehenden Tumoren**

In der Theorie kann der Prozess der Ausbildung der in den Mäusen gefundenen Metastasen in zwei Schritte aufgeteilt werden: die erste Herausforderung der intravenös eingebrachten Zellen besteht im Anwachsen im fremden Gewebe, also in der Bildung der Metastasen. Der zweite Schritt ist die Proliferation, sprich das Wachstum der einzelnen Metastasen. Erhält die Maus schon einen Tag vor Injektion der Krebszellen 4-OHT, so ist davon auszugehen, dass die p53-Mutanten von Beginn an aktiviert sind und schon bei der Initiation der Metastasen einen hemmenden Einfluss haben können. Die Maus wäre also, im weiteren Sinne, von vorne herein geschützt. Dies entspricht allerdings nicht dem Modell der Krebstherapie, da ein Malignom in der Regel zuerst entsteht, später entdeckt und im Folgenden behandelt wird. Deswegen war es von Interesse herauszufinden, ob auch eine später einsetzende p53-reaktivierende Behandlung die Zellzahl signifikant zu senken vermag. Hierfür wurden einer Gruppe von Mäusen  $10^6$  H1299-Zellen, die die unterschiedlichen H1-Helix-Mutanten enthielten, intravenös injiziert, wobei in den folgenden drei Wochen keine Behand-



**Abbildung 18: Die spät einsetzende p53-reaktivierende Behandlung reduziert die Zahl p53-positiver Metastasen sowie deren Gehalt p53-positiver Zellen bei bereits bestehenden Tumoren.**

Den Metastasen der zwei unbehandelten Mäuse (schwarze Punkte) wurden jeweils die Metastasen zweier repräsentativer Mäuse nach terminaler einwöchiger Behandlung mit Tamoxifen und Doxorubicin (graue Punkte) entgegengestellt. Die Behandlung führte bei den stark kooperativen p53-Mutanten zu einem signifikanten Abfall p53-positiver Metastasen sowie p53-positiver Zellen pro Metastase (vergleiche auch Abbildung 19). Jeder Punkt stellt eine Metastase dar, die Höhe des Punktes auf der Y-Achse gibt die Anzahl p53-positiver Zellen dieser Metastase wieder. Die rote Linie markiert den Mittelwert der p53-positiven Zellen pro untersuchter Metastase, die überstehende Zahl die Anzahl der p53-positiven Metastasen pro  $\text{mm}^2$ .

lung mit 4OHT oder Doxorubicin stattfand. In der vierten Woche wurden die Mäuse dann maximal therapiert, indem sie zur Aktivierung der p53-Mutanten täglich 4-OHT intraperitoneal sowie einmalig Doxorubicin intravenös injiziert bekamen. Als Vergleichsgruppe wurde eine Negativkontrolle mitgeführt: jeweils zwei Mäuse pro Konstrukt bekamen die H1299-Zellen injiziert, es erfolgte jedoch keine weitere Behandlung, sodass die Mutanten nie aktiviert wurden.

Bei der quantitativen Auswertung der Neoplasien zeigte sich, dass auch die späte Aktivierung mit einer Behandlungsdauer von nur einer Woche deutlich diminuierende Effekte auf die Zahl der p53-positiven Metastasen und deren Gehalt p53-positiver Zellen hatte (s. Abb. 18). Diese Reduktion von Zell- und Metastasenzahl korrelierte positiv mit der DNA-Bindungs Kooperativität der

p53-Mutanten.

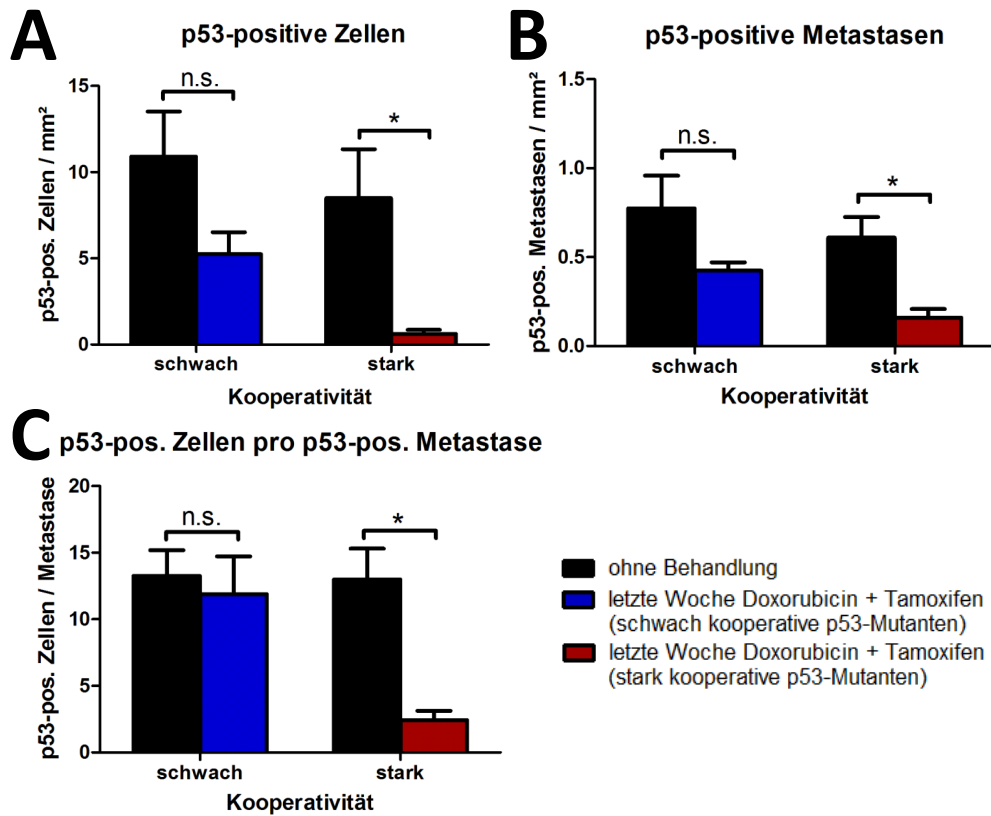
In der statistischen Auswertung wurde deutlich, dass sowohl die schwach, als auch die stark kooperativen Mutanten durch Induktion allein in der letzten Woche die Zell- und Metastasenzahl erniedrigten, es allerdings nur bei den stark kooperativen Konstrukten zu signifikanten Differenzen zur Kontrollgruppe kam (s. Abb. 19). Aufgrund der niedrigen Tierzahl bei den unbehandelten Tieren wurden jeweils die stark kooperativen Mutanten und die schwach kooperativen Mutanten gruppiert. Innerhalb der Kontrollgruppe zeigten sich zwischen den unterschiedlichen Konstrukten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zahl p53-positiver Zellen, Zahl p53-positiver Metastasen und der Anzahl p53-positiver Zellen pro p53-positiver Metastase.

Bezogen auf die Zahl p53-positiver Zellen fanden sich insgesamt bei den niedrig kooperativen Mutanten (RR, LR und EL) in der Behandlungsgruppe  $5,24 \pm 1,28$  Zellen/mm<sup>2</sup>; dies war zwar deutlich, aber nicht signifikant weniger als in der Kontrollgruppe ( $10,90 \pm 2,61$  Zellen/mm<sup>2</sup>). Bei den hoch kooperativen Mutanten (Wt und RE) vermochte die kombinierte Therapie die Zellzahlen auf unter 10% derer der Kontrollgruppe zu senken ( $8,50 \pm 2,84$  Zellen/mm<sup>2</sup> vs.  $0,62 \pm 0,24$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ ).

Bei der Anzahl der Metastasen zeigten sich ähnliche Tendenzen: durch die Therapie wurde die Zahl der p53-positiven Metastasen bei den schwach kooperativen Mutanten von  $0,77 \pm 0,18$  Metastasen/mm<sup>2</sup> auf  $0,42 \pm 0,05$  Metastasen/mm<sup>2</sup> gesenkt - eine Reduktion auf fast die Hälfte, der dennoch nicht zur statistischen Signifikanz reichte. Bei den stark kooperativen Mutanten erfolgte eine deutliche Verminderung der Metastasenzahl mit  $0,16 \pm 0,05$  Metastasen/mm<sup>2</sup> im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $0,61 \pm 0,12$  Metastasen/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ ).

Die durchschnittliche Zahl der p53-positiven Zellen pro p53-positiver Metastase hob sich bei den schwach kooperativen Konstrukten mit und ohne Behandlung kaum voneinander ab ( $13,26 \pm 1,94$  Zellen/Metastase vs.  $11,89 \pm 2,83$  Zellen/Metastase), wohingegen sich bei den stark kooperativen Konstrukten mit  $2,43 \pm 0,70$  Zellen/Metastase eine signifikante Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe zeigte ( $12,99 \pm 2,32$  Zellen/Metastase,  $p < 0,05$ ).

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse, dass auch die einwöchige Ak-



**Abbildung 19:** Eine einwöchige, erst nach drei Wochen einsetzende Therapie führt kooperativitätsabhängig zu niedrigeren Zahlen p53-positiver Zellen und Metastasen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe.

Quantifizierung der Immunfluoreszenz. Zahl p53-positiver Zellen (A), p53-positiver Metastasen (B) und p53-positiver Zellen pro p53-positiver Metastase (C) von einer unbehandelten Kontrollgruppe im Vergleich zu Mäusen, die erst drei Wochen nicht therapiert wurden, um dann in der letzten Woche sowohl Tamoxifen als auch Doxorubicin zu bekommen. Es wird deutlich, dass die späte Therapie einen deutlichen, kooperativitätsabhängigen, reduktiven Effekt auf die quantifizierten Parameter ausübt. Gezeigt sind Mittelwert und SEM, statistische Auswertung nach Mann-Whitney U. Gruppengröße: Bei schwacher Kooperativität ohne Behandlung 6 Tiere, Behandlungsgruppe 12 Tiere, bei starker Kooperativität ohne Behandlung 4 Tiere, Behandlungsgruppe 8 Tiere.

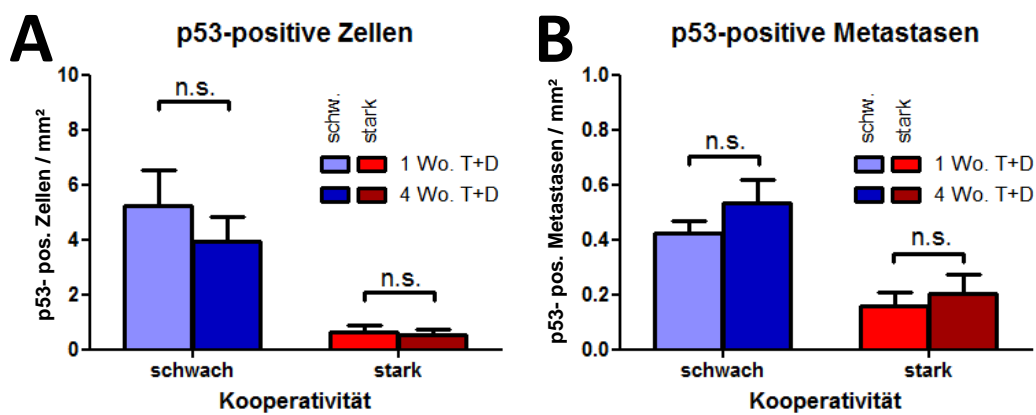


tivierung der p53-Mutanten in Kombination mit der Chemotherapie zu einer Reduktion von Zellzahl und Metastasenzahl im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe führte, die bei den stark kooperativen p53-Konstrukten signifikant ausgeprägt war.

#### **4.7 Die Aktivierung der p53-Mutanten in der letzten Woche zeigt ähnliche tumorsuppressive Effektivität wie deren kontinuierliche Aktivierung**

Bei onkologischen Therapien gilt es, die optimale Behandlungsdosis und einen angemessenen Behandlungszeitraum auszuloten. Diese müssen hoch, bzw. lang genug sein, um einen guten Behandlungserfolg zu gewährleisten. Eine zu intensive Therapie muss jedoch vermieden werden, um eventuelle Nebenwirkungen möglichst gering zu halten. Nach den in Kapitel 4.6 dargestellten Ergebnissen stellte sich die Frage, ob eine Therapie am Ende der Versuchszeit für einen guten Behandlungserfolg ausreichend sein könnte, oder ob eine Therapie über den gesamten Zeitraum hinweg den Behandlungserfolg zusätzlich steigert. Um dies näher zu untersuchen, wurde die zuletzt beschriebene Behandlungsgruppe, die in den ersten drei Wochen keine Behandlung, in der letzten Woche dann täglich 4-OHT und einmalig Doxorubicin erhielt, verglichen mit der Gruppe, die über den ganzen Zeitraum hinweg 4-OHT sowie einmalig Doxorubicin erhielt. In der ersten Gruppe waren die p53-Mutanten also nur eine Woche lang aktiviert, in der zweiten Gruppe vier Wochen lang.

Hierbei stellte sich heraus, dass weder die Gesamtzahl der p53-positiven Zellen, noch die der p53-positiven Metastasen bei längerer Behandlungsdauer signifikant niedriger war (s. Abb. 20). Drei zusätzliche Wochen, in denen die p53-Mutanten aufgrund von 4-OHT-Gabe aktiviert waren, vermochten bei den schwach kooperativen Konstrukten die Zellzahl moderat von  $5,24 \pm 1,28$  Zellen/mm<sup>2</sup> auf  $3,94 \pm 0,92$  Zellen/mm<sup>2</sup> zu senken (s. Abb. 20A). Bei den stark kooperativen Mutanten fiel der zytoreduktive Effekt der längeren Therapie noch geringer aus: die gefundenen p53-positiven Zellen lagen nach einwöchiger Therapie am Ende der Behandlungszeit bei  $0,62 \pm 0,24$  Zellen/mm<sup>2</sup>, bei vierwöchiger Behandlungszeit bei  $0,52 \pm 0,24$  Zellen/mm<sup>2</sup>.



**Abbildung 20: Die vierwöchige Therapie hat keinen signifikant stärkeren zytoreduktiven Effekt als die einwöchige Therapie.**

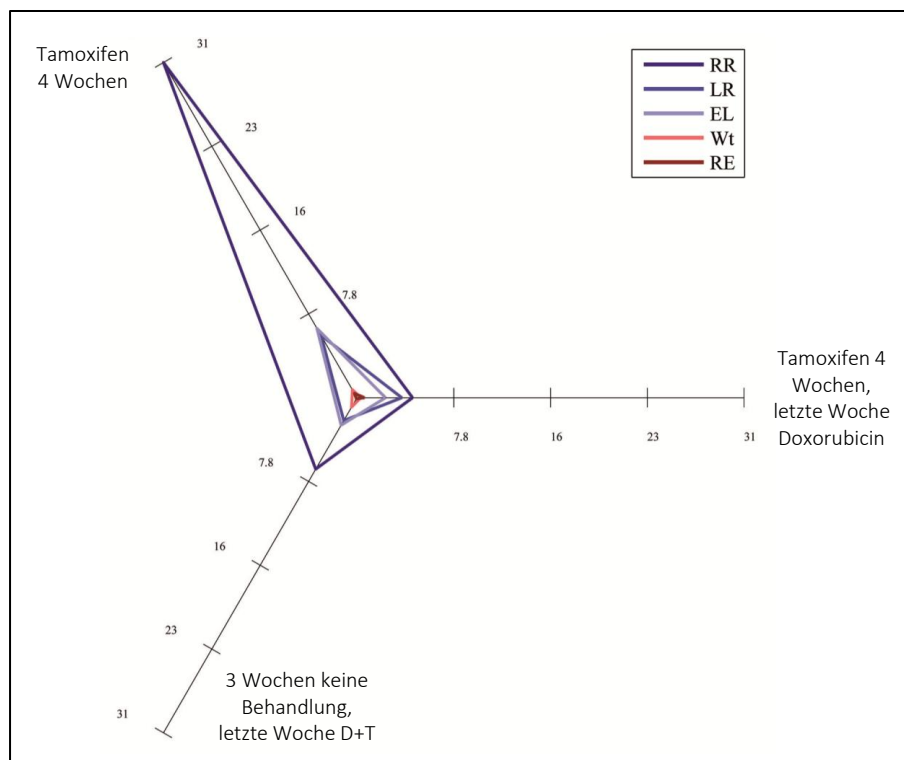
Dargestellt sind die Zell- (A) und Metastasenzahl (B) der Mäuse, die nach einer dreiwöchigen Beobachtungsphase eine Woche täglich mit Tamoxifen behandelt wurden, im Vergleich zu den Mäusen, die eine vierwöchige tägliche Tamoxifentherapie erhielten. Alle Mäuse erhielten eine einmalige intravenöse Doxorubicinbehandlung. T+D: Tamoxifen + Doxorubicin. schw.: schwache Kooperativität. stark: starke Kooperativität. Gezeigt sind Mittelwert und SEM, statistische Auswertung nach Mann-Whitney U. Gruppengröße: Bei schwacher Kooperativität und vierwöchiger Therapie 17 Tiere, einwöchige Therapie 12 Tiere, bei starker Kooperativität und vierwöchiger Therapie 12 Tiere, einwöchige Therapie 8 Tiere.

Bezüglich der Metastasenzahl fand sich bei den schwach kooperativen Mutanten sogar ein nichtsignifikanter Anstieg: waren es bei der einwöchigen Behandlung  $0,42 \pm 0,05$  Metastasen/mm<sup>2</sup> gewesen, so zeigten sich nach der vierwöchigen Therapie  $0,53 \pm 0,08$  Metastasen/mm<sup>2</sup> (s. Abb. 20B). Auch bei den stark kooperativen p53-Mutanten wurden keine signifikanten Unterschiede der Zahl der Metastasen gefunden ( $0,16 \pm 0,05$  Metastasen/mm<sup>2</sup> nach einwöchiger Behandlung vs.  $0,20 \pm 0,07$  Metastasen/mm<sup>2</sup> nach vierwöchiger Behandlung). Zusammenfassend lässt sich im Hinblick auf diese Ergebnisse sagen, dass die vierwöchige Aktivierung der p53-Mutanten im Vergleich zu einer einwöchigen Therapie in der letzten Beobachtungswoche nicht in der Lage ist, die Zahl der gefundenen p53-positiven Zellen und Metastasen signifikant zu vermindern. Die Mäuse profitierten also nicht von einer längerfristigen Aktivierung der p53-Konstrukte.

#### 4.8 Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse

Nach Injektion der H1299-Zellen mit den unterschiedlichen p53-Mutanten wurden die Mäuse auf drei unterschiedliche Arten behandelt: eine Gruppe von Mäusen erhielt täglich intraperitoneal 4-OHT, beginnend einen Tag vor Injektion der Zellen. Bei dieser Gruppe ist also davon auszugehen, dass die p53-Konstrukte über den vollen Versuchszeitraum aktiviert waren. Eine weitere Gruppe erhielt bezüglich des 4-OHT die gleiche Behandlung, zusätzlich jedoch nach drei Wochen eine einmalige intravenöse Injektion von Doxorubicin. Hier waren die p53-Mutanten dauerhaft aktiviert; zusätzlich wurde am 21. Behandlungstag durch die Chemotherapie ein DNA-Schaden gesetzt. Die dritte Gruppe von Mäusen wurde die ersten drei Wochen des Versuchszeitraums nicht behandelt, erhielt dann aber in der letzten Woche sowohl täglich 4-OHT intraperitoneal, als auch einmalig Doxorubicin intravenös. Hier waren die p53-Mutanten also drei Wochen lang nicht aktiviert gewesen, dann jedoch erfolgte die intensive Therapie durch Aktivierung der Konstrukte in Kombination mit einer Chemotherapie.

Die Zahl der p53-positiven Zellen korrelierte in allen Behandlungsgruppen invers mit der DNA-Bindungs Kooperativität der p53-Mutanten (s. Abb. 21). Hier ließen sich drei Gruppen ausmachen: RR besitzt eine sehr schwache Bindungs-



**Abbildung 21: Spider Plot.**

Auf den Achsen sind die verschiedenen Behandlungsgruppen dargestellt. Aufgetragen wurde jeweils die Zahl der p53-positiven Zellen/mm<sup>2</sup>, wonach die einzelnen Werte jedes p53-Mutanten zu Dreiecken verbunden wurden. D+T: Doxorubicin + Tamoxifen.

kooperativität, die Zahl der p53-positiven Zellen in den Lungen dieser Mäuse war deutlich am höchsten. Am offensichtlichsten war dies in der Gruppe der nur mit 4-OHT behandelten Mäuse, aber auch in den anderen Behandlungsgruppen zeigte sich RR am wenigsten tumorsuppressiv. LR und EL sind schwach kooperative Mutanten, die Anzahl p53-positiver Zellen lag hier im Mittelfeld. Weiterhin wurde deutlich, dass sich LR und EL bezüglich der Zahl der p53-positiven Zellen kaum unterschieden: ihre Kurven im Spider Plot (Abb. 21) schneiden sich, die Werte wichen nie deutlich voneinander ab. Auch der Wt und RE grenzten sich bezüglich ihrer Tumorsuppression nicht klar voneinander ab. Diese beiden stark kooperativen Varianten von p53 wiesen eine sehr niedrige Zahl p53-positiver Zellen in allen Behandlungsgruppen auf.

Im Vergleich der unterschiedlichen Behandlungsgruppen untereinander werden die zuvor beschriebenen Ergebnisse im Spider Plot im Überblick deutlich (s. Abb. 21). Die höchste Zahl p53-positiver Tumorzellen fand sich generell bei der Behandlungsgruppe, die nur mit 4-OHT behandelt wurde, wobei der Unterschied bei RR am deutlichsten hervortrat: hier betrug die Anzahl p53-positiver Zellen ein vielfaches derer der anderen Behandlungsgruppen. Auch LR und EL zeigten in den nur mit 4-OHT behandelten Mäusen höhere Zahlen p53-positiver Zellen, wobei die Werte hier nur noch etwa doppelt so hoch lagen wie in den anderen beiden Behandlungsgruppen. Die Mäuse, die immer 4-OHT und einmalig Doxorubicin erhalten hatten und die, die erst keine Behandlung und nur in der letzten Woche 4-OHT und einmalig Doxorubicin injiziert bekamen, zeigten bei allen p53-Varianten sehr ähnliche Zellzahlen. Es lässt sich also feststellen, dass es bezüglich der Anzahl p53-positiver Zellen keinen Unterschied machte, ob die p53-Mutanten die gesamten vier Wochen oder nur in der letzten Woche aktiviert wurden. Beim Wt und bei RE zeigten alle Behandlungsformen ähnliche zytoreduktive Effekte: hier genügt offensichtlich die Aktivierung der p53-Mutanten, eine zusätzliche Chemotherapie führt nicht zu einer weiteren Verminderung der Zellzahl.

Allgemein belegen diese Ergebnisse eine deutliche Abhängigkeit der Tumorsuppression sowie der Chemosensibilität der Zellen von der DNA-Bindungs-kooperativität, was bedeutet, dass die p53-DNA-Bindungs-kooperativität entscheidend das Ansprechen von Tumorzellen auf Chemotherapie prägt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Verlust von p53 in den Tumorzellen

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern die DNA-Bindungs Kooperativität von p53 in Karzinomzellen Einfluss auf Entstehung und Wachstum von Metastasen hat.

Hierfür wurden unterschiedlich kooperative p53-Mutanten über Retroviren in das Genom von H1299-Zellen integriert und im Mausmodell untersucht. Retrovirale Vektoren sind aufgrund ihrer Fähigkeit, genetisches Material stabil in das Genom einer Zelle zu integrieren, eine effiziente Grundlage für eine langfristige Expression des transfizierten Gens. Nach der Selektion ließ sich bei der Aktivierung der höher kooperativen p53-Konstrukte, RE und dem Wt, *in vitro* eine Apoptoseinduktion nachweisen.

Entgegen der Erwartungen jedoch blieb die protektive Wirkung der stärker kooperativen p53-Konstrukte bezüglich der Metastasenbildung in Lunge und Leber aus. Immunhistochemische Untersuchungen ergaben, dass der Hauptteil der Tumorzellen p53-negativ war, die stabil retroviral transduzierte DNA also nicht mehr transkribiert wurde.

Wie kann es zu der funktionellen Ausschaltung eines zunächst exprimierten Gens gekommen sein? Die retroviral integrierte DNA unterliegt epigenetischen Veränderungen, die zu einem Silencing, also zu einem Stopp der Transkription des Gens führen können (Ellis, 2005). Viele Proviren sind, z. B. durch die Integration in Heterochromatin, von vorne herein inaktiv (Mitchell, 2004). Die hier durchgeführte Selektion mit Puromycin hat die Zellen mit ausschließlich inaktiven Proviren eliminiert, nach der Selektion wurde also pro Zelle mindestens ein Provirus exprimiert. Doch auch initial transkribierte Proviren können im Laufe längerer Zellkultur oder im Rahmen einer Differenzierung funktionell ausgeschaltet werden (Niwa et al., 1983; Ellis, 2005), in der Regel durch DNA-Methylierung, Histonmodifikation, Chromatinremodelling und posttranskriptionelles Gen-Silencing (Iba et al., 2003).

Um diesem retroviralen Silencing zu entgehen, insbesondere, wenn das in das Genom integrierte Gen - wie hier - nicht zu einem Wachstumsvorteil führt, gäbe es für zukünftige vergleichbare Experimente mehrere Strategien: einerseits die Integration eines Insulators, der das Provirus vom Einfluss des umlie-

genden Chromatins abschirmt. Weiterhin könnte man sogenannte Chromatin Opening Elements, die zu einem Chromatinremodelling sowie zur transkriptionellen Aktivierung führen, in den Vektor einbringen. Problematisch hierbei ist jedoch, dass diese Elemente sind in der Regel relativ lang sind, sodass sie die Virusproduktion stören (Schott et al., 2015). Eine zusätzliche, in späteren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe verfolgte Möglichkeit stellt die Meganuklease-vermittelte zielgerichtete Integration dar, bei der das Gen an einen definierten Genloкус integriert und von hier über lange Zeit hinweg stabil exprimiert werden soll (Cabaniols et al., 2010). Die Versuche konnten jedoch keine gleichmäßig hohen Proteinlevel sowie keine induzierbare und effektive Aktivität von p53 garantieren (unpublizierte Daten). Eine weitere, ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe verfolgte Strategie stellte die Kopplung an eine zusätzlich in den Vektor klonierte Luziferase dar, anhand derer die Expressionslevel kontrolliert, selbstverständlich aber nicht beeinflusst werden konnten.

Ein anderer Ansatz wäre die Integration des Gens über Lentiviren. Auch durch diese Subklasse der Retroviren ist eine stabile Integration in das Genom möglich, im Gegensatz zu anderen Retroviren auch in sich nicht teilende Zellen. Ein Silencing kommt hier deutlich seltener vor (Pfeifer et al., 2002, Ellis, 2005), allerdings kann es auch hier zu der Integration einer unterschiedlichen Anzahl an Proviren in das Genom der Einzelzellen kommen und die p53-Expression wäre ebenfalls nicht homogen.

Eine Herausforderung dieser Arbeit war, dem Problem des Silencing der unterschiedlichen p53-Mutanten in der Auswertung gerecht zu werden. Bei den stark kooperativen p53-Mutanten herrscht ein höherer negativer Selektionsdruck als bei den schwach kooperativen, sodass es hier häufiger zu einem Silencing der transduzierten DNA kommt. Die Zellen, die kein aktives p53 mehr enthalten, stehen nicht mehr unter diesem Selektionsdruck und proliferieren deutlich stärker. Diese Zellen sind für die Untersuchung der DNA-Bindungs Kooperativität von p53 allerdings nicht mehr relevant, weswegen für diese Arbeit nur p53-positive Zellen ausgezählt wurden.

## 5.2 Der Einfluss der p53-Bindungs Kooperativität auf das Zellschicksal

Sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der p53-induzierten Tumorsuppression von der DNA-Bindungs Kooperativität. Die stark kooperative p53-Mutante RE sowie der Wt zeigten *in vitro* eine Apoptoseinduktion und, passend hierzu, *in vivo* eine sehr niedrige Anzahl p53-positiver Tumorzellen. Diese Effekte waren bei RE deutlicher ausgeprägt als bei dem Wt, zu signifikanten Differenzen zwischen beiden kam es in den histologischen Analysen jedoch nicht. Die schwächer kooperativen p53-Mutanten LR und EL zeigten keine signifikante Apoptoseinduktion *in vitro* und hierzu passend *in vivo* in allen Behandlungsgruppen deutlich mehr p53-positive Tumorzellen als RE und der Wildtyp. Auch LR und EL unterschieden sich in den Analysen nicht signifikant voneinander. Bei der sehr schwach kooperativen, *in vitro* ebenfalls apoptosedefekten Mutante RR war die Zahl p53-positiver Tumorzellen *in vivo* deutlich am höchsten.

Hieraus ergibt sich folgendes generelles Kooperativitätsspektrum, in steigender Anordnung:  $RR < LR \sim EL < Wt \sim RE$ . Dies ist weitestgehend mit bereits publizierten Daten unserer Arbeitsgruppe kongruent (Schlereth et al., 2010a,b, 2013). In den oben genannten Arbeiten waren zusätzlich signifikante Unterschiede zwischen RE und dem Wt gesehen worden. In meiner Arbeit waren diese Unterschiede tendenziell ersichtlich, aber nicht signifikant, was am ehesten auf niedrige Tierzahlen zurückzuführen sein könnte.

Einige interessante, in dieser Arbeit deutlich gewordene Aspekte der kooperativitätsabhängigen Tumorsuppressivität von p53 sollen im Folgenden näher diskutiert werden.

## 5.3 Die Behandlung mit Doxorubicin

Die Aktivierung von p53 durch die Chemotherapie mit Doxorubicin hatte in den *in vivo*-Versuchen nur bei der sehr niedrig kooperativen p53-Mutante RR signifikante zytoreduktive Effekte. Bei den schwach kooperativen p53-Mutanten LR und EL zeigte sich eine leichte, nicht signifikante Reduktion, die Tumore mit hochkooperativem p53 zeigten in vergleichenden Untersuchungen keine Reduktion p53-positiver Zellen und Tumore.



Dies lässt sich dahingehend interpretieren, dass bei den hochkooperativen Mutanten die alleinige Tamoxifen-vermittelte Freisetzung von p53 aus der inhibitorischen Bindung an zytoplasmatische Hitzeschockproteine einen so starken zytoreduktiven Effekt hat, dass dieser durch die Chemotherapie nicht noch weiter verstärkt werden kann. Bei der sehr schwach kooperativen Mutante RR hingegen hat die durchgeführte Chemotherapie zu weiteren DNA-Schäden geführt, die zu einer Phosphorylierung von p53 RR durch Kinasen wie zum Beispiel ATM führten (Blackford and Jackson, 2017). Die hieraus resultierende Aktivierung könnte zu der beobachteten Reduktion p53-positiver Zellen in den Tumoren geführt haben. Zu bedenken gilt, dass die Behandlung mit Doxorubicin hier in der Zellkultur keine Apoptose induzieren konnte (8, 9). Dies steht im Einklang zu anderen Arbeiten, in denen für p53 RR ebenfalls gezeigt wurde, dass es nicht in der Lage ist, Apoptose zu induzieren. Es konnte allerdings demonstriert werden, dass p53 RR *in vitro* zu Zellzyklusarrest führt (Schlereth et al., 2010a), und dass es Zellzyklusarrest und Seneszenz *in vivo* induzieren kann (Timofeev et al., 2013). Somit ist die Reduktion p53-positiver Zellen und Tumore unter Doxorubicintherapie bei p53 RR am ehesten auf die vermehrte Induktion von Zellzyklusarrest und Seneszenz, und nicht auf Apoptose, zurückzuführen.

Beachtet werden sollte, dass der zytoreduktive Effekt bei p53 RR auch an der Toxizität von Doxorubicin liegen und p53-unabhängig sein könnte. So wurde nachgewiesen, dass niedrige Dosen von Doxorubicin auch in Abwesenheit von p53 zu Seneszenz und zur subsequenten Autophagie führen können (Yang et al., 2012). Senescente Zellen werden *in vivo* durch das Immunsystem abgeräumt (Xue et al., 2007). Die durch Doxorubicin induzierte p53-unabhängige Apoptose ist zelltypabhängig; so zeigten Wang et al. (2004), dass für die Doxorubicin-induzierte Apoptose in den dort untersuchten Tumorzellen p53 essentiell ist, in den ebenfalls untersuchten nichtmalignen Endothelzellen und Kardiomyozyten hingegen wurde die Apoptose vornehmlich durch Sauerstoffradikale hervorgerufen und fand auch unter Blockade von p53 statt. Letztendlich hätte man durch eine zusätzliche Gruppe mit komplett inaktivem p53 differenzieren können, ob es sich bei der beobachteten Reduktion p53-positiver Zellen unter Chemotherapie um einen Effekt der verstärkten p53-Aktivierung oder um eine Auswirkung der Toxizität von Doxorubicin handelt.

## 5.4 Eliminierung von p53-positiven Zellen in bereits bestehenden Tumoren

Die p53-reaktivierende Therapie stellt das realitätsnächste Modell in Bezug auf die Tumorthherapie dar, da man klinisch in der Regel mit einem vorhandenen Tumor konfrontiert sein wird, den es zu behandeln gilt, sei es durch eine p53 reaktivierende Therapie oder durch eine gezielte Steigerung der proapoptotischen Aktivität von p53.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine p53-reaktivierende Therapie bereits bestehender Tumore die Anzahl p53-positiver Zellen und Metastasen zu reduzieren vermochte. Bei den hoch kooperativen Konstrukten war diese Reduktion signifikant, bei den niedrig kooperativen Konstrukten konnte eine Reduktion nachgewiesen werden, die jedoch keine Signifikanz erreichte. Dies könnte einerseits den niedrigen Tierzahlen einzelner Untergruppen geschuldet sein. Andererseits ließe sich argumentieren, dass für die Eliminierung der p53-positiven Zellen in bereits bestehenden Tumoren die proapoptotischen Eigenschaften von p53 essentiell sind, welche die hoch kooperativen Mutanten ausüben können, die niedrig kooperativen hingegen nicht.

Kritisch sei hier anzumerken, dass die Behandlungszeit von einer Woche vor Histologisierung noch nicht das vollständige Ausmaß der durch Seneszenz hervorgerufenen Zellreduktion niedrig kooperativer p53-Mutanten abbildet. Xue et al. (2007) konnten in einem Mausmodell mit induzierbarem p53 zeigen, dass die Reaktivierung von p53 in hepatozellulären Karzinomen vornehmlich zu einer Induktion von Seneszenz führte, auf die in vivo eine Tumorregression folgte, bei der nach 12 Tagen praktisch kein Tumor mehr nachweisbar war. Seneszenz führte zu einer Hochregulation proinflammatorischer Zytokine und bestimmter Adhäsionsmoleküle, woraufhin in der Umgebung seneszenten Zellen eine Entzündungsreaktion hervorgerufen wurde, die in einer Zerstörung von Tumor und Neovaskularisierung mündete. Eine entzündliche Infiltration der Tumorherde konnte bei der histologischen Auswertung der Proben dieser Arbeit allerdings nicht nachgewiesen werden. Hier muss bedacht werden, dass die C;129S4-Rag2tm1.1FlvIl2rgtm1.1Flv-Mäuse, die für diese Arbeit verwendet wurden, weder B-, noch T-Lymphozyten, noch Natürliche Killerzellen produzieren können. Für die Clearance von seneszenten Zellen werden aber

CD4-positive T-Zellen benötigt (Kang et al., 2011), sodass eine Clearance seneszenten Zellen in diesen Mäusen wahrscheinlich nicht oder nur sehr eingeschränkt möglich ist. Zudem könnte selbst in immunkompetenten Mäusen eine Woche zu kurz gewesen sein für die durch Seneszenz verursachte Zellreduktion. Die Apoptoseinduktion hingegen geht schneller vonstatten: Eine erste Welle der Apoptoseinduktion findet normalerweise 30 min nach DNA-Schaden aufgrund einer Akkumulation von p53 in den Mitochondrien statt. Die zweite Welle findet deutlich später statt und ist abhängig von den Konzentrationen proapoptotischer und proarrest-Proteine, ebenfalls moduliert von p53 (Elias et al., 2014). Die durch Apoptose hervorgerufene Zellreduktion lässt sich durch Histologisierung nach einer Woche insgesamt hinreichend abbilden.

Ventura et al. (2007) stellten fest, dass die therapeutische Restauration von endogenem p53 bei unterschiedlichen autochthonen Tumorentitäten unterschiedliche Auswirkungen hat. So kam es in Lymphomen zu einer Apoptose der Tumorzellen, und dies mit deutlicher Reduktion der Tumormasse schon innerhalb der ersten 96 Stunden, in Sarkomen hingegen zur Seneszenz und somit zu einer deutlich langsameren Reduktion der Tumormasse. Da es in dieser Arbeit nur bei den hoch kooperativen Konstrukten zu einer signifikanten Reduktion p53-positiver Zellen und Metastasen kam, wohingegen bei den apoptosedefekten niedrig kooperativen p53-Mutanten keine signifikante Reduktion nachgewiesen werden konnte, scheint in diesem NSCLS-Allograftmodell die Apoptose eine essentielle Rolle zu spielen. Ob es bei längerer Beobachtung nach der Behandlung auch bei den niedrig kooperativen Konstrukten zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl p53-positiver Zellen und Metastasen gekommen wäre, ist aber nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen.

## **5.5 Eine diskontinuierliche Aktivierung von p53 gewährleistet ebenfalls effektiven Schutz vor Tumoren**

Insbesondere interessant war die Feststellung, dass - unter identischem chemotherapeutischem Regime mit Doxorubicin - die bereits diskutierte Aktivierung der p53-Mutanten in nur der letzten Woche ähnliche tumorsuppressive Effektivität wie deren kontinuierliche Aktivierung über vier Wochen zeigte. Hieraus lässt sich die These formulieren, dass keine kontinuierliche Aktivierung von

p53 notwendig ist, um einen effektiven Schutz zu gewährleisten. Diese Annahme wird gestützt durch die Beobachtung von Christophorou et al. (2006), die herausfanden, dass schon eine kurze, transiente Periode von p53-Aktivierung ausreicht für einen signifikanten tumorprotektiven Effekt: Anhand eines Mausmodells mit induzierbarem p53 wies die Arbeitsgruppe nach, dass Mäuse, die acht Tage nach Ganzkörperbestrahlung einer sechstägigen transienten Aktivierung von p53 unterzogen wurden, signifikant vor der Entwicklung von Lymphomen geschützt waren. Gleichzeitig waren die Mäuse mit der verzögerten transienten Aktivierung von p53 vor der akuten p53-induzierten Strahlentoxizität geschützt. Ebenso stellten Xue et al. (2007) im murinen Lebertumor-Allograft-Modell fest, dass schon eine viertägige p53-reaktivierende Therapie in p53-defizienten Tumoren zu einer Komplettremission der Karzinome führte. Bezüglich p53 muss kritisch beachtet werden, dass es nicht nur ein potenter Krebschutz ist, sondern ebenso ein Determinator der Nebenwirkungen von Krebstherapien, da p53 ebenfalls zu einem exzessiven apoptotischen Zellsterben des mitbehandelten gesunden Gewebes führt. Therapeutisch interessant wäre eine transiente systemische Inhibition von p53 unter Bestrahlung oder Chemotherapie (Gudkov and Komarova, 2005), da eine aggressivere Therapie möglich ist, wenn p53-induzierte Nebenwirkungen reduziert werden können (Vousden and Lane, 2007). Schon Clarke et al. (1993) zeigten, dass p53-negative Thymozyten resistent sind gegen Apoptose, die durch DNA-Doppelstrangbruch induziert wird. p53-defiziente Mäuse überlebten Bestrahlungsdosen, die für p53-Wt-Mäuse längst lethal sind (Westphal et al., 1997). Im Menschen ist bekannt, dass p53-Mutationen, die zu einer leichten Defizienz führen, zwar mit einem erhöhten Krebsrisiko, jedoch ebenfalls mit Langlebigkeit assoziiert sind, da p53 zu Zellalterung führt (van Heemst et al., 2005). Somit wäre bei gezielter transienter Inhibition und Induktion von p53 in korrekter zeitlicher Abfolge theoretisch eine aggressivere und somit effizientere Krebstherapie bei gleichzeitiger Reduktion der Nebenwirkungen möglich.

## 5.6 Kooperativitätsmutanten von p53 in humanen Tumoren

Von den in dieser Arbeit untersuchten p53-Mutanten mit unterschiedlicher DNA-Bindungs Kooperativität wurde in menschlichen Tumoren tatsächlich nur p53 EL beschrieben, bei der das Arginin in Position 181 durch ein Leucin ersetzt ist. In der IARC Tp53 Database werden die p53-Mutanten funktionell klassifiziert nach ihrer transkriptionellen Aktivität an acht Promotoren, deren Gene das Spektrum von Zellzyklusarrest über Seneszenz bis zu Apoptose aufspannen (Kato et al., 2003). p53 EL ist hier klassifiziert als „partially functional“, das heißt, die durchschnittliche funktionelle transkriptionelle Aktivität an diesen Promotoren liegt zwischen 20% und 75%, gemessen an p53 Wt. Dies ist kongruent zu den Ergebnissen dieser Arbeit. p53 EL kann durch nur eine einzelne Punktmutation in der Mittelposition des Codons entstehen. Alle anderen in dieser Arbeit untersuchten Mutanten dagegen implizieren mindestens zwei Punktmutationen und wurden daher bisher nicht in menschlichen Tumoren nachgewiesen. In humanen Neoplasien hingegen existieren andere Mutationen im Bereich der H1-Helix, die zu einer Verminderung der DNA-Bindungs Kooperativität führen, wie zum Beispiel die sporadischen Mutationen R181 zu His oder Cys und E180 zu Lys. Weiterhin kommen Keimbahnmutationen im Bereich der H1-Helix vor, die zu einem Li-Fraumeni-Syndrom führen, einer autosomal dominant vererbten Prädisposition, die mit multiplen Malignomen schon im frühen Lebensalter einhergeht. All diese Mutanten wiesen in vitro einen selektiven Defekt der apoptotischen Funktion auf (Schlereth et al., 2010a).

## 5.7 Therapeutische Ansätze

Die DNA-Bindungs Kooperativität und ihr Einfluss auf die Tumorsuppression sind ein junges Kapitel in der Geschichte des viel beforschten Tumorsuppressors p53. Zu kaum einem anderen Molekül gibt es derart viele Publikationen und seit vielen Jahren wird nach therapeutischen Möglichkeiten bei Mutation oder Inaktivierung von p53 gesucht.

Bereits als Medikament auf dem Markt erhältlich sind Gentherapien, die versuchen, Wildtyp-p53 wiederherzustellen. Zumeist wird p53 hierbei mittels repli-

kationsdefekter Adenoviren in die Zellen eingebracht, aufgrund der niedrigen Transduktionsrate sind jedoch auch konditionell replizierende Vektorsysteme in der Entwicklung. Seit 2003 ist Gendicine, das erste und bislang einzige zugelassene Medikament, in China auf dem Markt, allerdings nur für die Behandlung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches und hier auch nur in Kombination mit Radiotherapie. Advexin, ein weiteres Medikament zur p53-Gentherapie, wurde bislang nicht zugelassen, und der Konzern, der es entwickelt hat, ist inzwischen geschlossen.

Bezüglich p53-Gentherapie bei NSCLC konnte in einigen Studien eine Verlängerung der Zeit bis zur Progression bei nur geringen Nebenwirkungen erzielt werden, das Gesamtüberleben wurde jedoch nicht gesteigert (Guan et al., 2009). Andere Untersuchungen erbrachten gar keinen signifikanten Vorteil gegenüber der Standardtherapie (Chen et al., 2014, Schuler et al., 2001), sodass die p53-Gentherapie bei Bronchialkarzinomen keine Zulassung hat.

Weiterer Gegenstand intensiver Forschung sind Moleküle, die die Wechselwirkung zwischen p53 und MDM2, seinem negativen Regulator, inhibieren. Die ersten klinischen Studien deuten auf eine Effektivität dieser Medikamente hin, aufgrund der Hochregulation von p53 auch in gesundem Gewebe jedoch bei nicht unerheblichen Nebenwirkungen. Ein zusätzlicher interessanter Ansatz sind Chaperone und Small Molecules, die an p53 binden und seine Konformation stabilisieren. Insbesondere bei Strukturmutationen, die zu einer Herabsetzung des Schmelzpunktes der DNA-Bindungsdomäne und somit zu einem höheren Anteil an ungefaltetem Protein führen, könnte eine Stabilisierung der gefalteten Konformation den Anteil an funktionellem p53 erhöhen (Joerger and Fersht, 2016). Bei der initial erwähnten hohen Inzidenz an mutiertem p53 wäre eine Restauration von mutiertem p53 ein sehr sinnvoller Ansatz (Khoo et al., 2014).

Die Untersuchungen zu der DNA-Bindungs Kooperativität sind zur Zeit Thema der Grundlagenforschung. Therapeutisch bieten sich hier hoch interessante Ansätze 5.8. Bevor Interventionsstudien mit Patienten durchgeführt werden können, sind jedoch zahlreiche weitere Untersuchungen nötig.

## 5.8 Ausblick

Ob die DNA-Bindungs Kooperativität von p53 *in vivo* reguliert wird, ist zur Zeit noch unbekannt (Timofeev et al., 2013). Hier ergeben sich jedoch interessante und vielversprechende Interventionsmöglichkeiten, sowohl bezüglich der Steigerung, als auch bezüglich der Senkung der DNA-Bindungs Kooperativität. Eine Steigerung verlagert das Reaktionsspektrum in Richtung Apoptose, was zu einem verstärkten Ansprechen von Tumorzellen auf Radiochemotherapie führen sollte. Bei Patienten mit genetisch determiniertem erhöhtem Krebsrisiko könnte auch über eine prophylaktische konstitutive Steigerung der DNA-Bindungs Kooperativität nachgedacht werden, wobei hier Nebeneffekte einer p53-Überaktivierung, wie die Depletion von Stamm- und Progenitorzellen und die hieraus resultierenden Gewebsschäden, die letztendlich zu einer vorzeitigen Alterung führen, bedacht werden müssen (Reinhardt and Schumacher, 2012). Eine transiente Senkung der DNA-Bindungs Kooperativität der übrigen Körperzellen hingegen könnte zu einer Absenkung der Nebenwirkungen unter Bestrahlung und Chemotherapie insbesondere bei p53-negativen Tumoren führen. Eine Senkung der Nebenwirkungen macht wiederum höhere Dosierungen möglich, sodass Therapien effizienter durchgeführt werden könnten. Wenn Christophorou et al. (Christophorou et al., 2006) zeigen, dass die transiente Nichtaktivierung von p53 unter Bestrahlung zu einem Schutz vor p53-induzierter Strahlentoxizität schützt, so ist anzunehmen, dass eine Senkung der DNA-Bindungs Kooperativität einen ähnlichen Effekt erzielen könnte. Eine Inhibition nur der proapoptotischen Funktionen von p53 unter Erhalt anderer tumorsuppressiver Funktionen könnten die Risiken einer kompletten Blockade von p53 vermindern.

Die vorliegende Arbeit liefert essentielle Grundsteine zum Verständnis und zu den Auswirkungen der DNA-Bindungs Kooperativität von p53. In Zukunft sind *in-vivo*-Untersuchungen zu der Regulation der DNA-Bindungs Kooperativität von p53 in unterschiedlichen Tumorentitäten notwendig, um diesem hoffnungsvollen therapeutischen Target nachzugehen. Ein konkreter Ansatz wären zum Beispiel Untersuchungen in spontan entstandenen Tumoren zu der Applikabilität von Small Molecules, die die DNA-Bindungs Kooperativität von p53 modulieren, unter Radio- und Chemotherapie. Die Option, den Einfluss von p53 auf das Zellschicksal differenziert zu regulieren, eröffnet eine innovative und potente Möglichkeit im Kampf gegen Krebserkrankungen.

## Literatur

- A. J. Alberg and J. M. Samet. Epidemiology of lung cancer. *Chest*, 123(1 Suppl):21S–49S, Jan 2003.
- M. Ashcroft, Y. Taya, and K. H. Vousden. Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol. Cell. Biol.*, 20(9):3224–3233, May 2000.
- Y. Barak, T. Juven, R. Haffner, and M. Oren. mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.*, 12(2):461–468, Feb 1993.
- I. Beno, K. Rosenthal, M. Levitine, L. Shaulov, and T. E. Haran. Sequence-dependent cooperative binding of p53 to DNA targets and its relationship to the structural properties of the DNA targets. *Nucleic Acids Res.*, 39(5):1919–1932, Mar 2011.
- A. N. Blackford and S. P. Jackson. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell*, 66(6):801–817, Jun 2017.
- A. M. Bode and Z. Dong. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer*, 4(10):793–805, Oct 2004.
- C. A. Brady and L. D. Attardi. p53 at a glance. *J. Cell. Sci.*, 123(Pt 15):2527–2532, Aug 2010.
- J. P. Brown, W. Wei, and J. M. Sedivy. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science*, 277(5327):831–834, Aug 1997.
- J. Brugarolas, C. Chandrasekaran, J. I. Gordon, D. Beach, T. Jacks, and G. J. Hannon. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature*, 377(6549):552–557, Oct 1995.
- J. P. Cabaniols, C. Ouvry, V. Lamamy, I. Fery, M. L. Craplet, N. Moulharat, S. P. Guenin, S. Bedut, O. Nosjean, G. Ferry, S. Devavry, C. Jacqmarcq,



- 
- C. Lebuhotel, L. Mathis, C. Delenda, J. A. Boutin, P. Duchateau, F. Coege, and F. Paques. Meganuclease-driven targeted integration in CHO-K1 cells for the fast generation of HTS-compatible cell-based assays. *J Biomol Screen*, 15(8):956–967, Sep 2010.
- F. Carrier, P. T. Georgel, P. Pourquier, M. Blake, H. U. Kontny, M. J. Antinore, M. Gariboldi, T. G. Myers, J. N. Weinstein, Y. Pommier, and A. J. Fornace. Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin. *Mol. Cell. Biol.*, 19(3):1673–1685, Mar 1999.
- Y. L. Chang, C. T. Wu, J. Y. Shih, and Y. C. Lee. Comparison of p53 and epidermal growth factor receptor gene status between primary tumors and lymph node metastases in non-small cell lung cancers. *Ann. Surg. Oncol.*, 18(2):543–550, Feb 2011.
- G. X. Chen, S. Zhang, X. H. He, S. Y. Liu, C. Ma, and X. P. Zou. Clinical utility of recombinant adenoviral human p53 gene therapy: current perspectives. *Onco Targets Ther*, 7:1901–1909, 2014.
- X. Chen, L. J. Ko, L. Jayaraman, and C. Prives. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev.*, 10(19):2438–2451, Oct 1996.
- Y. Chen, R. Dey, and L. Chen. Crystal structure of the p53 core domain bound to a full consensus site as a self-assembled tetramer. *Structure*, 18(2):246–256, Feb 2010.
- J. E. Chipuk, T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes, N. M. Droin, D. D. Newmeyer, M. Schuler, and D. R. Green. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, 303(5660):1010–1014, Feb 2004.
- J. E. Chipuk, L. Bouchier-Hayes, T. Kuwana, D. D. Newmeyer, and D. R. Green. PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science*, 309(5741):1732–1735, Sep 2005.
- Y. Cho, S. Gorina, P. D. Jeffrey, and N. P. Pavletich. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, 265(5170):346–355, Jul 1994.

- 
- M. A. Christophorou, I. Ringshausen, A. J. Finch, L. B. Swigart, and G. I. Evan. The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression. *Nature*, 443(7108):214–217, Sep 2006.
- A. R. Clarke, C. A. Purdie, D. J. Harrison, R. G. Morris, C. C. Bird, M. L. Hooper, and A. H. Wyllie. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*, 362(6423):849–852, Apr 1993.
- S. Cory and J. M. Adams. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer*, 2(9):647–656, Sep 2002.
- W. Cosme-Blanco, M. F. Shen, A. J. Lazar, S. Pathak, G. Lozano, A. S. Multani, and S. Chang. Telomere dysfunction suppresses spontaneous tumorigenesis in vivo by initiating p53-dependent cellular senescence. *EMBO Rep.*, 8(5):497–503, May 2007.
- A. Dehner, C. Klein, S. Hansen, L. Muller, J. Buchner, M. Schwaiger, and H. Kessler. Cooperative binding of p53 to DNA: regulation by protein-protein interactions through a double salt bridge. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 44(33):5247–5251, Aug 2005.
- G. D’Orazi, B. Cecchinelli, T. Bruno, I. Manni, Y. Higashimoto, S. Saito, M. Gostissa, S. Coen, A. Marchetti, G. Del Sal, G. Piaggio, M. Fanciulli, E. Appella, and S. Soddu. Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat. Cell Biol.*, 4(1):11–19, Jan 2002.
- W. S. el Deiry. Regulation of p53 downstream genes. *Semin. Cancer Biol.*, 8(5):345–357, 1998.
- W. S. el Deiry, S. E. Kern, J. A. Pietenpol, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.*, 1(1):45–49, Apr 1992.
- J. Elias, L. Dimitrio, J. Clairambault, and R. Natalini. The p53 protein and its molecular network: modelling a missing link between DNA damage and cell fate. *Biochim. Biophys. Acta*, 1844(1 Pt B):232–247, Jan 2014.

- J. Ellis. Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors. *Hum. Gene Ther.*, 16(11):1241–1246, Nov 2005.
- D. M. Feldser and C. W. Greider. Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. *Cancer Cell*, 11(5):461–469, May 2007.
- S. A. Gatz and L. Wiesmuller. p53 in recombination and repair. *Cell Death Differ.*, 13(6):1003–1016, Jun 2006.
- J. P. Goldman, M. P. Blundell, L. Lopes, C. Kinnon, J. P. Di Santo, and A. J. Thrasher. Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor gamma chain. *Br. J. Haematol.*, 103(2):335–342, Nov 1998.
- D. R. Green and G. Kroemer. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*, 458(7242):1127–1130, Apr 2009.
- P. A. Groome, V. Bolejack, J. J. Crowley, C. Kennedy, M. Krasnik, L. H. Sobin, and P. Goldstraw. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol*, 2(8):694–705, Aug 2007.
- B. Gu and W. G. Zhu. Surf the post-translational modification network of p53 regulation. *Int. J. Biol. Sci.*, 8(5):672–684, 2012.
- Y. S. Guan, Y. Liu, Q. Zou, Q. He, Z. La, L. Yang, and Y. Hu. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in combination with bronchial arterial infusion for treatment of advanced non-small-cell lung cancer, one year follow-up. *J Zhejiang Univ Sci B*, 10(5):331–340, May 2009.
- A. V. Gudkov and E. A. Komarova. Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331(3):726–736, Jun 2005.
- Q. Hao and W. C. Cho. Battle Against Cancer: An Everlasting Saga of p53. *Int J Mol Sci*, 15(12):22109–22127, 2014.
- Y. Haupt, R. Maya, A. Kazaz, and M. Oren. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387(6630):296–299, May 1997.

- H. Hermeking, C. Lengauer, K. Polyak, T. C. He, L. Zhang, S. Thiagalingam, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell*, 1(1):3–11, Dec 1997.
- R. Honda, H. Tanaka, and H. Yasuda. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.*, 420(1):25–27, Dec 1997.
- H. Iba, T. Mizutani, and T. Ito. SWI/SNF chromatin remodelling complex and retroviral gene silencing. *Rev. Med. Virol.*, 13(2):99–110, 2003.
- A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.*, 61(2):69–90, 2011.
- L. Jiang, M. K. Siu, O. G. Wong, K. F. Tam, X. Lu, E. W. Lam, H. Y. Ngan, X. F. Le, E. S. Wong, L. J. Monteiro, H. Y. Chan, and A. N. Cheung. iASPP and chemoresistance in ovarian cancers: effects on paclitaxel-mediated mitotic catastrophe. *Clin. Cancer Res.*, 17(21):6924–6933, Nov 2011.
- Z. Jin and W. S. El-Deiry. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.*, 4(2):139–163, Feb 2005.
- A. C. Joerger and A. R. Fersht. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu. Rev. Biochem.*, 77:557–582, 2008.
- A. C. Joerger and A. R. Fersht. The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(6):a000919, Jun 2010.
- A. C. Joerger and A. R. Fersht. The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. *Annu. Rev. Biochem.*, 85: 375–404, Jun 2016.
- C. Kandoth, M. D. McLellan, F. Vandin, K. Ye, B. Niu, C. Lu, M. Xie, Q. Zhang, J. F. McMichael, M. A. Wyczalkowski, M. D. Leiserson, C. A. Miller, J. S. Welch, M. J. Walter, M. C. Wendl, T. J. Ley, R. K. Wilson, B. J. Raphael, and L. Ding. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 502(7471):333–339, Oct 2013.
- T. W. Kang, T. Yevsa, N. Woller, L. Hoenicke, T. Wuestefeld, D. Dauch, A. Hohmeyer, M. Gereke, R. Rudalska, A. Potapova, M. Iken, M. Vucur,

- 
- S. Weiss, M. Heikenwalder, S. Khan, J. Gil, D. Bruder, M. Manns, P. Schirmacher, F. Tacke, M. Ott, T. Luedde, T. Longerich, S. Kubicka, and L. Zender. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*, 479(7374):547–551, Nov 2011.
- M. B. Kastan, Q. Zhan, W. S. el Deiry, F. Carrier, T. Jacks, W. V. Walsh, B. S. Plunkett, B. Vogelstein, and A. J. Fornace. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, 71(4):587–597, Nov 1992.
- S. Kato, S. Y. Han, W. Liu, K. Otsuka, and R. and Ishioka C. Shibata, H. and Kanamaru. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(14):8424–8429, Jul 2003.
- J. F. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26(4):239–257, Aug 1972.
- K. H. Khoo, K. K. Hoe, C. S. Verma, and D. P. Lane. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nat Rev Drug Discov*, 13(3):217–236, Mar 2014.
- M. Kitayner, H. Rozenberg, R. Rohs, O. Suad, D. Rabinovich, B. Honig, and Z. Shakked. Diversity in DNA recognition by p53 revealed by crystal structures with Hoogsteen base pairs. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 17(4):423–429, Apr 2010.
- C. Klein, E. Planker, T. Diercks, H. Kessler, K. P. Kunkele, K. Lang, S. Hansen, and M. Schwaiger. NMR spectroscopy reveals the solution dimerization interface of p53 core domains bound to their consensus DNA. *J. Biol. Chem.*, 276(52):49020–49027, Dec 2001.
- M. Kracikova, G. Akiri, A. George, R. Sachidanandam, and S. A. Aaronson. A threshold mechanism mediates p53 cell fate decision between growth arrest and apoptosis. *Cell Death Differ.*, 20(4):576–588, Apr 2013.

- 
- J. P. Kruse and W. Gu. Modes of p53 regulation. *Cell*, 137(4):609–622, May 2009.
- M. H. Kubbutat and K. H. Vousden. Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability. *Mol Med Today*, 4(6):250–256, Jun 1998.
- M. F. Lavin and N. Gueven. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ.*, 13(6):941–950, Jun 2006.
- A. J. Levine and M. Oren. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer*, 9(10):749–758, Oct 2009.
- L. K. Linares, A. Hengstermann, A. Ciechanover, S. Muller, and M. Scheffner. HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(21):12009–12014, Oct 2003.
- T. D. Littlewood, D. C. Hancock, P. S. Danielian, M. G. Parker, and G. I. Evan. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res.*, 23(10):1686–1690, May 1995.
- J. Liu, C. Zhang, and Z. Feng. Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 46(3):170–179, Mar 2014.
- B. Ma and A. J. Levine. Probing potential binding modes of the p53 tetramer to DNA based on the symmetries encoded in p53 response elements. *Nucleic Acids Res.*, 35(22):7733–7747, 2007.
- W. Maltzman and L. Czyzyk. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.*, 4(9):1689–1694, Sep 1984.
- D. Menendez, A. Inga, and M. A. Resnick. The expanding universe of p53 targets. *Nat. Rev. Cancer*, 9(10):724–737, Oct 2009.
- B. F. und Schroder A. R. und Shinn P. und Chen H. und Berry C. C. und Ecker J. R. und Bushman F. D. Mitchell, R. S. und Beitzel. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol.*, 2(8):E234, Aug 2004.

- 
- T. Miyashita and J. C. Reed. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80(2):293–299, Jan 1995.
- J. L. Moreland, A. Gramada, O. V. Buzko, Q. Zhang, and P. E. Bourne. The Molecular Biology Toolkit (MBT): a modular platform for developing molecular visualization applications. *BMC Bioinformatics*, 6:21, Feb 2005.
- J. P. Morgenstern and H. Land. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res.*, 18(12):3587–3596, Jun 1990.
- K. Nakano and K. H. Vousden. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell*, 7(3):683–694, Mar 2001.
- D. W. Nicholson and N. A. Thornberry. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.*, 22(8):299–306, Aug 1997.
- O. Niwa, Y. Yokota, H. Ishida, and T. Sugahara. Independent mechanisms involved in suppression of the Moloney leukemia virus genome during differentiation of murine teratocarcinoma cells. *Cell*, 32(4):1105–1113, Apr 1983.
- E. Oda, R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi, and N. Tanaka. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 288(5468):1053–1058, May 2000a.
- K. Oda, H. Arakawa, T. Tanaka, K. Matsuda, C. Tanikawa, T. Mori, H. Nishimori, K. Tamai, T. Tokino, Y. Nakamura, and Y. Taya. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*, 102(6):849–862, Sep 2000b.
- J. D. Oliner, J. A. Pietenpol, S. Thiagalingam, J. Gyuris, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature*, 362(6423):857–860, Apr 1993.
- L. B. Owen-Schaub, W. Zhang, J. C. Cusack, L. S. Angelo, S. M. Santee, T. Fujiwara, J. A. Roth, A. B. Deisseroth, W. W. Zhang, and E. Kruzel.

- 
- Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol. Cell. Biol.*, 15(6):3032–3040, Jun 1995.
- A. Pfeifer, M. Ikawa, Y. Dayn, and I. M. Verma. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(4):2140–2145, Feb 2002.
- C. Prives and P. A. Hall. The p53 pathway. *J. Pathol.*, 187(1):112–126, Jan 1999.
- H. C. Reinhardt and B. Schumacher. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet.*, 28(3):128–136, Mar 2012.
- T. Riley, E. Sontag, P. Chen, and A. Levine. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9(5):402–412, May 2008.
- T. M. Rippin, S. M. Freund, D. B. Veprintsev, and A. R. Fersht. Recognition of DNA by p53 core domain and location of intermolecular contacts of cooperative binding. *J. Mol. Biol.*, 319(2):351–358, May 2002.
- Y. Samuels-Lev, D. J. O’Connor, D. Bergamaschi, G. Trigianta, J. K. Hsieh, S. Zhong, I. Campargue, L. Naumovski, T. Crook, and X. Lu. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol. Cell*, 8(4):781–794, Oct 2001.
- M. Scheffner, B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, and P. M. Howley. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63(6):1129–1136, Dec 1990.
- K. Schlereth, R. Beinoraviciute-Kellner, M. K. Zeitlinger, A. C. Bretz, M. Sauer, J. P. Charles, F. Vogiatzi, E. Leich, B. Samans, M. Eilers, C. Kisker, A. Rosenwald, and T. Stiewe. DNA binding cooperativity of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol. Cell*, 38(3):356–368, May 2010a.



- K. Schlereth, J. P. Charles, A. C. Bretz, and T. Stiewe. Life or death: p53-induced apoptosis requires DNA binding cooperativity. *Cell Cycle*, 9(20):4068–4076, Oct 2010b.
- K. Schlereth, C. Heyl, A. M. Krampitz, M. Mernberger, F. Finkernagel, M. Scharfe, M. Jarek, E. Leich, A. Rosenwald, and T. Stiewe. Characterization of the p53 cistrome–DNA binding cooperativity dissects p53’s tumor suppressor functions. *PLoS Genet.*, 9(8):e1003726, 2013.
- J. W. Schott, D. Hoffmann, and A. Schambach. Retrovirus-based vectors for transient and permanent cell modification. *Curr Opin Pharmacol*, 24:135–146, Sep 2015.
- M. Schuler, R. Herrmann, J. L. De Greve, A. K. Stewart, U. Gatzemeier, D. J. Stewart, L. Laufman, R. Gralla, J. Kuball, R. Buhl, C. P. Heussel, F. Kommos, A. P. Perruchoud, F. A. Shepherd, M. A. Fritz, J. A. Horowitz, C. Huber, and C. Rochlitz. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients receiving chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: results of a multicenter phase II study. *J. Clin. Oncol.*, 19(6):1750–1758, Mar 2001.
- P. A. Speth, Q. G. van Hoesel, and C. Haanen. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clin Pharmacokinet*, 15(1):15–31, Jul 1988.
- E. Steels, M. Paesmans, T. Berghmans, F. Branle, F. Lemaitre, C. Mascaux, A. P. Meert, F. Vallot, J. J. Lafitte, and J. P. Sculier. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Eur. Respir. J.*, 18(4):705–719, Oct 2001.
- H. Tidow, R. Melero, E. Mylonas, S. M. Freund, J. G. Grossmann, J. M. Carazo, D. I. Svergun, M. Valle, and A. R. Fersht. Quaternary structures of tumor suppressor p53 and a specific p53 DNA complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104(30):12324–12329, Jul 2007.
- O. Timofeev, K. Schlereth, M. Wanzel, A. Braun, B. Nieswandt, A. Pagenstecher, A. Rosenwald, H. P. Elsasser, and T. Stiewe. p53 DNA binding cooperativity is essential for apoptosis and tumor suppression in vivo. *Cell Rep*, 3(5):1512–1525, May 2013.

- 
- William D Travis. *Pathology & Genetics: Tumours of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart*, volume 7. Iarc, 2004.
- L. J. Valente, D. H. Gray, E. M. Michalak, J. Pinon-Hofbauer, A. Egle, C. L. Scott, A. Janic, and A. Strasser. p53 efficiently suppresses tumor development in the complete absence of its cell-cycle inhibitory and proapoptotic effectors p21, Puma, and Noxa. *Cell Rep*, 3(5):1339–1345, May 2013.
- D. van Heemst, S. P. Mooijaart, M. Beekman, J. Schreuder, A. J. de Craen, B. W. Brandt, P. E. Slagboom, and R. G. Westendorp. Variation in the human TP53 gene affects old age survival and cancer mortality. *Exp. Gerontol.*, 40(1-2):11–15, 2005.
- A. V. Vaseva and U. M. Moll. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim. Biophys. Acta*, 1787(5):414–420, May 2009.
- A. Ventura, D. G. Kirsch, M. E. McLaughlin, D. A. Tuveson, J. Grimm, L. Lintault, J. Newman, E. E. Reczek, R. Weissleder, and T. Jacks. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*, 445(7128):661–665, Feb 2007.
- B. Vogelstein, D. Lane, and A. J. Levine. Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810):307–310, Nov 2000.
- K. H. Vousden and D. P. Lane. p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8(4):275–283, Apr 2007.
- K. H. Vousden and X. Lu. Live or let die: the cell’s response to p53. *Nat. Rev. Cancer*, 2(8):594–604, Aug 2002.
- K. H. Vousden and C. Prives. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, 137(3):413–431, May 2009.
- S. Wang, E. A. Konorev, S. Kotamraju, J. Joseph, S. Kalivendi, and B. Kalyanaraman. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. intermediacy of H(2)O(2)- and p53-dependent pathways. *J. Biol. Chem.*, 279(24):25535–25543, Jun 2004.

- 
- J. D. Weber, L. J. Taylor, M. F. Roussel, C. J. Sherr, and D. Bar-Sagi. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat. Cell Biol.*, 1(1):20–26, May 1999.
- R. L. Weinberg, D. B. Veprintsev, M. Bycroft, and A. R. Fersht. Comparative binding of p53 to its promoter and DNA recognition elements. *J. Mol. Biol.*, 348(3):589–596, May 2005.
- C. H. Westphal, S. Rowan, C. Schmaltz, A. Elson, D. E. Fisher, and P. Leder. atm and p53 cooperate in apoptosis and suppression of tumorigenesis, but not in resistance to acute radiation toxicity. *Nat. Genet.*, 16(4):397–401, Aug 1997.
- I. I. Wistuba, A. F. Gazdar, and J. D. Minna. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Semin. Oncol.*, 28(2 Suppl 4):3–13, Apr 2001.
- W. Xue, L. Zender, C. Miething, R. A. Dickins, E. Hernando, V. Krizhanovsky, C. Cordon-Cardo, and S. W. Lowe. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, 445(7128):656–660, Feb 2007.
- M. Y. Yang, P. M. Lin, Y. C. Liu, H. H. Hsiao, W. C. Yang, J. F. Hsu, C. M. Hsu, and S. F. Lin. Induction of cellular senescence by doxorubicin is associated with upregulated miR-375 and induction of autophagy in K562 cells. *PLoS ONE*, 7(5):e37205, 2012.
- X. Zhang, M. Wang, C. Zhou, S. Chen, and J. Wang. The expression of iASPP in acute leukemias. *Leuk. Res.*, 29(2):179–183, Feb 2005.
- X. Zhou, J. M. Liao, W. J. Liao, and H. Lu. Scission of the p53-MDM2 Loop by Ribosomal Proteins. *Genes Cancer*, 3(3-4):298–310, Mar 2012.

## Abbildungsverzeichnis

1	Der p53-Signalweg. . . . .	14
2	Die Struktur von p53. . . . .	15
3	H1-Helix-Interaktionen von p53 tragen zur kooperativen DNA-Bindung bei. . . . .	19
4	Die H1-Helix-Mutanten von p53. . . . .	25
5	Verwedete Längenstandards. . . . .	30
6	DNA-Sequenzierung der H1-Helix-Mutanten in H1299-Zellen. . . . .	58
7	Die verschiedenen p53-Mutanten führen zu quantitativ vergleichbarer Proteinexpression. . . . .	59
8	Für die Induktion des proapoptotischen Zielgens Noxa ist hohe Kooperativität essentiell. . . . .	60
9	Für die Induktion von Caspase 3-Aktivität ist hohe Kooperativität essentiell. . . . .	62
10	Intravenös injizierte H1299-Zellen induzieren Tumore in der Leber immundefizienter Mäuse. . . . .	64
11	Intravenös injizierte H1299-Zellen induzieren Tumore in der Lunge immundefizienter Mäuse. . . . .	67
12	Die DNA-Bindungs Kooperativität hat keinen Einfluss auf das Gewicht der Lebern und Lungen der behandelten Mäuse. . . . .	68
13	Vergleichbare Anzahl und Größe der Metastasen im Lungengewebe bei Mäusen mit unterschiedlichen H1-Helix-Mutanten. . . . .	69
14	Die Stärke der DNA-Bindungs Kooperativität korreliert invers mit der Anzahl der p53-positiven Zellen in den Lungentumoren. . . . .	71
15	Eine starke DNA-Bindungs Kooperativität führt zu einer Reduktion an p53-positiven Zellen und Metastasen. . . . .	72
16	Die DNA-Bindungs Kooperativität korreliert invers mit Anzahl und Gehalt p53-positiver Zellen der in der Lunge gefundenen p53-positiven Tumore. . . . .	74

17	Die Behandlung mit Doxorubicin zusätzlich zu Tamoxifen hat nur bei niedriger Kooperativität signifikante tumorreduktive Effekte. . . . .	76
18	Die spät einsetzende p53-reaktivierende Behandlung reduziert die Zahl p53-positiver Metastasen sowie deren Gehalt p53-positiver Zellen bei bereits bestehenden Tumoren. . . . .	78
19	Eine einwöchige, erst nach drei Wochen einsetzende Therapie führt kooperativitätsabhängig zu niedrigeren Zahlen p53-positiver Zellen und Metastasen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe. . . . .	80
20	Die vierwöchige Therapie hat keinen signifikant stärkeren zytoreduktiven Effekt als die einwöchige Therapie. . . . .	82
21	Spider Plot. . . . .	84
22	Scoresheet für Versuchstiere . . . . .	111
23	Kompletter Scan des Western Blots (siehe auch Abb. 7: Die verschiedenen p53-Mutanten führen zu quantitativ vergleichbarer Proteinexpression.) . . . . .	112



---

# Anhang

## Scoresheet Versuch zur pulmonalen Tumorentwicklung:

**Versuchstier Nr/Linie**  
**Datum der i.v. Gabe von H1299/Zellzahl**  
**Tamoxifen-Injektion (i.p.)**  
**Datum**

### **Erscheinungsbild**

- 0 normale Fellpflege
- 1 kein Grooming
- 2 rüdiges Fell (falls vorhanden)
- 3 rüdiges Fell (falls vorhanden), bucklige Haltung, trübe Augen

### **allgemeines Verhalten**

- 0 normales Verhalten
- 1 leicht verringerte Aktivität
- 2 abnormales Verhalten (Isolation, eingeschränkte Motilität)  
extreme Lautäußerung, Selbstverstümmelung, extreme
- 3 Aufgeregtheit, Apathie, Reglosigkeit)

### **Verhalten beim Handling**

- 0 normales Abwehrverhalten
- 1 geringfügige Depression, leicht erhöhte Alarmbereitschaft
- 2 verminderte Reaktion, geringe Abwehr beim Handling
- 3 Apathie bei Handling

### **Atemfrequenz**

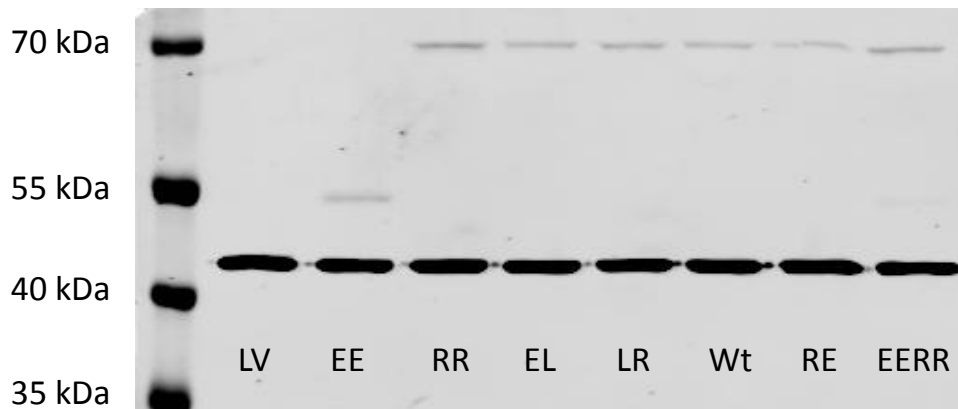
- 0 normal
- 1 leicht erhöht
- 2 leicht erhöht + abdominale Atmung
- 3 erniedrigt + starke abdominale Atmung

### **Summe**

- 0-2 unbedenklich
  - 3-5 unter erhöhter Beobachtung halten  
Tier leidet, zweite Meinung einholen, Terminierung des Versuchs in
  - 6-8 Betracht ziehen (durch zervikale Dislokation)
  - >8 Terminierung des Versuchs durch zervikale Dislokation
- Tiere, die bei mehr als einem Kriterium 3 Punkte erhalten, werden durch zervikale Dislokation getötet.

## **Abbildung 22: Scoresheet für Versuchstiere**

Der gesundheitliche Zustand der C;129S4-Rag2<sup>tm1.1Flv</sup>Il2rg<sup>tm1.1Flv</sup>-Mäuse wurde täglich kontrolliert und mit Hilfe des Scoresheets dokumentiert.



**Abbildung 23: Kompletter Scan des Western Blots (siehe auch Abb. 7: Die verschiedenen p53-Mutanten führen zu quantitativ vergleichbarer Proteinexpression.)**

Die DNA der H1-Helix-Mutanten war durch retrovirale Transduktion stabil in das Genom der H1299-Zellen eingebracht worden. Die Ladungskontrolle beim Western Blot erfolgte mit  $\beta$ -Aktin (42 kDa). Die Mutanten RR, EL, LR, RE, EERR und der Wt zeigen aufgrund der Kopplung an den modifizierten Östrogenrezeptor ( $ER^{TAM}$ -System) eine größere Molekülmasse. LV: Leervektor.



---

## Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren

Adamkiewicz	Kill	Renz
Aumüller	Klose	Richter
Basler	König	Riße
Bartsch	Koolman	Röhm
Barth	Lill	Ruchholz
Baum	Löffler	Schäfer
Becker	Lohoff	Schütz
Cordes	Maier	Schmidt
Czubayko	Maisch	Schoner
Daut	Mandrek	Seifart
Elsässer	Maschuw	Sekundo
Feuser	Moll	Sommer
Giese	Moosdorf	Steiniger
Gress	Mueller	Stiewe
Grzeschik	Mutters	Suske
Hertl	Neubauer	Vogelmeier
Hilt	Neumüller	Wagner
Hofmann	Pagenstecker	Weihe
Hoyer	Plant	Wulff
Jaques	Ramaswamy	Wündisch

Meine akademischen Lehrer in Badajoz, Spanien, waren

Alvarez Morales	Gallardo Vaquez	Muñoz Sanz
Benitez Rodriguez	Llerena Ruiz	Soledad Salcedo
Campillo Alvarez	Lopez Vinueza	Vaz Leal
Fernandez-Vigo Lopez	Morales Lopez	

---

## Danksagung

Mein aufrichtiger Dank geht an

Prof. Dr. Thorsten Stiewe und Jeannette Fuchs für die Bereitstellung des Themas, die kontinuierliche wissenschaftliche Betreuung und die uneingeschränkte Unterstützung in praktischen wie in theoretischen Fragen.

Prof. Dr. Elsässer, Waltraut und Siggie für die Hilfe bei der Histologie.

Die AG Stiewe und das restliche IMT für die Unterstützung bei meiner Arbeit, insbesondere auch Jeannette und Antje für Hilfe bei den Mäusen und Joel für die FACSe.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung.

Lisa und Charlotte, für die gemeinsame Zeit im Labor.

Petra und die ganze Biobank, für die Unterstützung und Motivation.

Meine Familie, die immer für mich da ist. Danke für eure Geduld.

Meine Freunde, die die Entstehung dieser Arbeit, die Höhen und Tiefen, die langen Laborabende und die Zeit des Schreibens geduldig mirverfolgt haben. Danke für die Zeit in der Bib, das Korrekturlesen, die Motivation und die gute Zeit. Danke, Gundi, Lisa, Nora, Andrea, Pablo, Mari Paz, Juani, Eve, Inka und Gesche, ihr macht mein Leben lebenswert.

Usch, für alles. Du bist unglaublich.