

Aus dem Institut für Molekulare Onkologie

Direktor: Prof. Dr. Thorsten Stiewe

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Phosphorylierung der p53 H1-Helix: Rolle für Tumorsuppression und Tumorigenese

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

Edmund Constantin Niederau

aus Siegen

Marburg, 2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

17.07.2023

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin.

Dekanin: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. Thorsten Stiewe

1. Koreferent: Prof. Dr. Oliver Rick

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	7 -
2	Zusammenfassung	9 -
3	Summary	10 -
4	Einleitung	11 -
4.1	Krebserkrankungen und deren Entstehung	11 -
4.2	p53 – Wächter des Genoms	13 -
4.2.1	Struktur von p53	13 -
4.2.2	Aufbau und Bedeutung des p53-DNA-Komplexes	14 -
4.2.3	Bedeutung von Serin 183 und 185	16 -
4.2.4	Übersicht der Funktionen von p53	17 -
4.2.5	Regulation von p53 durch Mdm2	19 -
4.2.6	Kontrolle des Zellzyklus durch p53	20 -
4.2.7	Induktion von Apoptose durch p53	21 -
4.3	Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	23 -
5	Material	26 -
5.1	Lösungen, Puffer und Medien	26 -
5.1.1	Lösungen, Puffer und Medien für die Zellkultur	26 -
5.1.2	Lösungen, Puffer und weitere Reagenzien für molekularbiologische Untersuchungen	26 -
5.1.3	Lösungen, Puffer und weitere Reagenzien für die Proteinbiochemie	27 -
5.1.4	Lösungen und Puffer für SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese und Western-Blot	27 -
5.1.5	Lösungen und Puffer für Immunfluoreszenz-Analysen	28 -
5.1.6	Lösungen und Puffer für die tierexperimentellen Methoden	28 -
5.1.7	Material für histologische Untersuchungen	29 -
5.2	Zelllinien	31 -
5.3	Mauslinien	32 -
5.4	Antikörper	34 -
5.4.1	Primäre Antikörper	34 -
5.4.2	Sekundäre Antikörper	34 -
5.5	Oligonukleotide	35 -
5.5.1	Oligonukleotide zur Analyse von humanem Genom	35 -
5.5.2	Oligonukleotide zur Analyse von murinem Genom	35 -
5.6	Adenoviren	35 -
5.7	Größenstandards	36 -
5.8	Kits	36 -
5.9	Verbrauchsmaterialien	37 -
5.10	Laborgeräte	38 -
6	Methoden	40 -
6.1	Zellbiologische Methoden	40 -
6.1.1	Allgemeine Kultivierungsbedingungen	40 -
6.1.2	Auftauen von Zellen	40 -
6.1.3	Passagieren von Zellen	40 -
6.1.4	Einfrieren von Zellen	41 -
6.1.5	Bestimmung der Zellzahl	41 -

6.1.6 Adenovirale Infektion	42 -
6.1.7 Auswahl von Einzelzellklonen nach adenoviraler Infektion	42 -
6.1.8 Incucyte-Monitoring	42 -
6.2 Molekularbiologische Methoden	44 -
6.2.1 Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration	44 -
6.2.2 Isolation von RNA	44 -
6.2.3 Synthese von cDNA	44 -
6.2.4 <i>Quantitative reverse transcription PCR</i>	44 -
6.2.5 Isolation von genomischer DNA	46 -
6.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46 -
6.2.7 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	47 -
6.2.8 Probenvorbereitung für Sequenzierungsanalysen	48 -
6.2.9 Zell-Bioimaging via BD Pathway™-Analyse	48 -
6.3 Proteinbiochemische Methoden	50 -
6.3.1 Herstellung von Zelllysaten	50 -
6.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	50 -
6.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50 -
6.3.4 Western-Blot und Immundetektion	51 -
6.3.5 Herstellung von TBS-T für Western-Blot-Analysen	52 -
6.4 Durchflusszytometrische Analysen (FACS)	53 -
6.4.1 Standardverfahren und PI-Färbung	53 -
6.4.2 Annexin-V Apoptose Assay	54 -
6.5 Tierexperimentelle Methoden	55 -
6.5.1 Allgemeine Haltungsbedingungen	55 -
6.5.2 Sektion der Versuchstiere	55 -
6.5.3 Chemische Kanzerogenese in p53 ^{SA} -Mäusen	55 -
6.5.4 CRISPR-induzierte Aktivierung des <i>Eml4-Alk</i> -Onkogens in p53 ^{SA} -Mäusen	56 -
6.6 Histologische Methoden	61 -
6.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	61 -
6.6.2 Immunhistochemische Färbungen	62 -
6.6.3 Auswertung der histologischen Proben	63 -
6.7 Statistische Methoden	64 -
7 Ergebnisse	65 -
7.1 Charakterisierung der CRISPR-modifizierten HCT116 p53-Phospho-Mutanten	65 -
7.1.1 Nachweis der korrekt eingebrachten Mutation in Codon 183 und 185	65 -
7.1.2 Analyse der p53-Expression in Einzelzellklonen	67 -
7.1.3 Die Phospho-Mutanten sind polyklonal und exprimieren GFP	70 -
7.1.4 Nach erneuter AdCre-Infektion liegt eine äquimolare p53-Expression vor	71 -
7.1.5 Die <i>phospho-mimic</i> Mutante ist Apoptose-resistent gegenüber genotoxischem Stress	74 -
7.1.6 p53 ^{-AA} führt zu einer deutlich stärkeren Induktion von p53-Zielgenen als p53 ^{-DD}	77 -
7.2 Chemische Induktion von Karzinomen bei der p53 ^{SA} -Maus	79 -
7.2.1 Induktion von Tumoren durch 3-Methylcholantren nach s.c.-Injektion	80 -
7.2.2 Analyse der Tumorigenese von p53 ^{WT} - und p53 ^{SA} -Mäusen bei 3-MC induzierter Kanzerogenese	80 -
7.3 CRISPR-induzierte <i>Eml4-Alk</i> -Aktivierung zur Generierung von NSCLCs	82 -
7.3.1 Das Ad-Cas9-Cre- <i>Eml4-Alk</i> -Virus induziert das <i>Eml4-Alk</i> -Fusionsgen <i>in-vitro</i>	83 -
7.3.2 GLuc- und FLuc-Messungen ermöglichen teilweise den Nachweis und die Lokalisation von Tumoren	85 -
7.3.3 Lungentumoren sind zuverlässig durch μ MRT-Messungen detektierbar	88 -
7.3.4 Das onkogene <i>Eml4-Alk</i> -Fusionsgen ist auch <i>in-vivo</i> induzierbar	88 -
7.3.5 Die <i>phospho-deficient</i> p53 ^{SA} -Maus zeigt eine geringere Tumorlast	90 -
7.3.6 Vergleichbare Aktivität der spezifischen Malignitätsmarker bei immunhisto-chemischen Untersuchungen	92 -
8 Diskussion	94 -
8.1 Potenzielle Einflüsse der experimentellen Techniken	95 -

8.1.1 Chemische Induktion von Fibrosarkomen.....	- 95 -
8.1.2 CRISPR-vermittelte Induktion von NSCLCs.....	- 96 -
8.1.3 Die p53 ^{SA} -Maus zeigt eine ausgeprägte tumorsuppressive Aktivität bezüglich CRISPR-induzierter NSCLCs.....	- 98 -
8.1.4 Die Luciferase-Messungen zeigen nur eine eingeschränkte Korrelation mit dem Tumorprogress.....	- 99 -
8.1.5 <i>In-vitro</i> Analysen humaner Karzinomzelllinien.....	- 101 -
8.2 Bedeutung und Relevanz der Ergebnisse.....	- 103 -
8.2.1 Die fehlende Phosphorylierung der p53 ^{SA} -Maus hat keine Relevanz bei der 3-MC induzierten Kanzerogenese.....	- 103 -
8.2.2 Die p53 ^{SA} -Maus entfaltet ihre tumorsuppressive Aktivität vor allem in frühen Tumorstadien.....	- 104 -
8.2.3 Die p53-vermittelten Einflüsse auf Tumorigenese und Tumorsuppression sind abhängig vom Tumorstadium.....	- 106 -
8.2.4 Die tumorsuppressive Aktivität der p53 ^{SA} -Maus ist modellabhängig.....	- 107 -
8.2.5 Die erhöhte Apoptoserate der <i>phospho-deficient</i> p53-Mutante lässt sich nicht auf <i>PUMA</i> oder <i>NOXA</i> zurückführen.....	- 108 -
8.3 Ausblick.....	- 110 -
Literaturverzeichnis.....	- 111 -
Abbildungsverzeichnis.....	- 122 -
Anhang.....	- 123 -
Verzeichnis der akademischen Lehrenden.....	- 128 -
Danksagung.....	- 129 -

1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin
AA	Punktmutation von Ser183 & Ser185 humaner Zellen zu Alanin
AdCre	Adeno-Cre
ALK	<i>anaplastic lymphoma kinase gene</i>
APC	Allophycocyanin
BLI	Biolumineszenz-Imaging
bp	<i>base pairs</i>
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CaCl₂	Calciumchlorid
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cPARP	<i>cleaved poly(ADP-ribose) polymerase</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CTD	Carboxyterminale-Domäne
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBD	DNA-Bindungs-Domäne
DD	Punktmutation von Ser183 & Ser185 humaner Zellen zu Aspartat
dest.H₂O	destilliertes Wasser
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	<i>deoxynucleotide triphosphates</i>
E	Glutamat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EML4	<i>echinoderm microtubule-associated protein-like 4 gene</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLuc	Firefly-Luciferase
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GLuc	Gaussia-Luciferase
GOF	<i>gain of function</i>
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HKG	<i>housekeeping gene</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
INK4	<i>inhibitors of CDK4</i>
i.p.	intraperitoneal
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
K₃Fe(CN)₆	Kaliumhexacyanidoferrat (III)
K₄Fe(CN)₆	Kaliumhexacyanidoferrat (II)
K.O.	<i>knocked out</i>

M	Mol
OD	Oligomerisations-Domäne
OIS	Onkogen-induzierte Seneszenz
MDM2	<i>murine double minute 2 homolog</i>
mg	Milligramm
MgCl	Magnesiumchlorid
mL	Milliliter
mM	Millimol
MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
mV	Millivolt
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromol
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
NaCl₂	Natriumchlorid
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
nM	Nanomol
NOXA	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein</i>
NSCLC	<i>non-small-cell lung cancer</i>
p-ERK	<i>phospho-extracellular signal-regulated kinases</i>
PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>plaque forming units</i>
PI	Propidium-Iodid
PRD	Prolin-reiche Domäne
PTM	post-translationale Modifikationen
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
q-RT-PCR	<i>quantitative reverse transcription polymerase-chain-reaction</i>
R	Arginin
RE	<i>responsive element</i>
RNA	<i>ribonucleotide acid</i>
ROS	reaktive oxidative Spezies
SA	Serin zu Alanin-Punktmutation
s.c.	subcutan
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
T	Thymin
TAD	Transaktivierungs-Domäne
TIGAR	<i>TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator</i>
TP53	<i>tumor protein 53 gene</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
V	Volt

2 Zusammenfassung

Das p53-Tumorsuppressorgen, auch als „Wächter des Genoms“ bekannt, ist das am häufigsten mutierte Gen in humanen Krebszellen. Im physiologischen Zustand wird es durch verschiedene Stimuli wie oxidativer Stress, DNA-Schäden oder Onkogen-Überexpression aktiviert, sodass p53 als Transkriptionsfaktor diverse Mechanismen mit dem Hauptziel der Tumorsuppression einleiten kann. Dabei spielen Effekte wie ein transienter Zell-Zyklus-Arrest mit dem Zweck der DNA-Reparatur, Seneszenz, ein irreversibler Arrest, und Apoptose, der programmierte Zelltod, eine entscheidende Rolle. Durch diese Mechanismen kann eine Zelle vor der potenziellen Entartung geschützt werden, bzw. eine bereits entartete Zelle im Zellzyklus gestoppt werden, um die Tumorigenese zu unterbinden.

Da Krebszellen nicht in jedem Fall durch eine p53-Aktivierung dem programmierten Zelltod zugeführt werden, ergibt sich die notwendige Fragestellung, unter welchen Umständen p53 den Signalweg in Richtung Seneszenz oder in Richtung Apoptose anstößt. Für die Erklärung wird versucht, den Mechanismus der DNA-Bindungs-Kooperativität als Grundlage zu verwenden. Denn p53 agiert nicht als Monomer, sondern bindet als Tetramer sequenzspezifisch an die DNA. Die DNA-Bindungs-Kooperativität ermöglicht p53 eine effizientere Bindung an Promotoren. Für einen stabilen p53-DNA-Komplex sind dabei Interaktionen innerhalb der DNA-Bindungsdomänen entscheidend, die durch die ionischen Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureresten der so genannten H1-Helix vermittelt werden. Diese enthält in humanem p53 jeweils ein Glutamat in Position 180, ein Arginin in Position 181 sowie in direkter Nachbarschaft zur H1-Helix zwei evolutionär konservierte Serin-Moleküle in den Positionen 183 und 185.

In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass Mutationen in der H1-Helix, die zu einem Verlust der DNA-Bindungs-Kooperativität führen, die transkriptionelle Aktivität von p53 vollständig unterbinden können, während eine abgeschwächte Kooperativität die transkriptionelle Aktivität in Richtung der pro-seneszenten Gene lenkt. Im Gegenteil bewirkt eine verstärkte DNA-Bindungs-Kooperativität die forcierte Transkription von pro-apoptotischen Genen. Bei der Frage, ob die Interaktion zwischen den H1-Helices beeinflusst werden kann, spielen die beiden Serin-Moleküle in den Positionen 183 und 185 eine interessante Rolle. Eine Phosphorylierung dieser Aminosäurereste könnte durch die elektromagnetischen Eigenschaften von Phosphatgruppen in einer verstärkten negativen Ladung der H1-Helix-Region resultieren und somit die DNA-Bindungs-Kooperativität beeinflussen. Experimentelle Daten aktueller Forschung lassen vermuten, dass die erwähnte enzymatische Reaktion an diesen Serin-Resten möglicherweise durch Aurora-Kinasen, insbesondere Aurora B, vermittelt wird.

Zur genaueren Untersuchung der Rolle von Phosphorylierungen der Serinmoleküle für die Funktion von p53 wurde in dieser Arbeit die Krebszelllinie HCT116 mit *phospho-mimic* und *phospho-deficient* Mutationen an den Positionen 183 und 185 verwendet. Hier konnte ein signifikant verstärkter Zelluntergang der *phospho-deficient* Mutanten unter zytotoxischer Behandlung mit Doxorubicin gezeigt werden. Da Mäuse nur über einen konservierten Serin-Rest in Position 180 verfügen, wurde bei den *in-vivo* Experimenten mit der S180A-Mutante gearbeitet, wo der Serin-Rest in Position 180 zum *phospho-deficient* Alanin geändert wurde. Hier konnten abhängig vom Versuchsaufbau ebenfalls signifikante Unterschiede in der Tumorsuppression und Tumorigenese gezeigt werden.

Letztlich kann das Wissen um die Blockierung der Phosphorylierung, beispielsweise durch eine Inhibition der verantwortlichen Kinasen, einen hohen klinischen Nutzen hervorbringen. So könnten Kinaseinhibitoren die prognostisch wichtigen Funktionen von p53 im Sinne der Tumorsuppression und Verhinderung der Tumorigenese günstig beeinflussen, indem entartete Zellen intensiver der Apoptose zugeführt werden. Ebenso wäre eine therapeutisch abgeschwächte Kooperativität mit dem Ziel eines verringerten Effekts von Zytostatika auf gesunde Zellen denkbar.

3 Summary

The p53 tumor suppressor gene, also known as “guardian of the genome”, is the most frequently mutated gene in human cancer cells. In its physiological state, p53 is activated by various stimuli such as oxidative stress, DNA damage, or oncogene overexpression, allowing p53 as a transcription factor to initiate diverse mechanisms with the main goal of tumor suppression. Effects like a transient cell cycle arrest with the purpose of DNA repair, senescence as an irreversible arrest of the cell cycle, and apoptosis, also known as the programmed cell death, play a crucial role. Through these mechanisms, a cell can either be protected from transformation or the proliferation of a damaged cell can be blocked to prevent tumorigenesis. Since cancer cells are not always eliminated by programmed cell death through p53 activation, the necessary question arises under which circumstances p53 triggers the signaling pathway towards senescence or towards apoptosis. To investigate this decision-making, we attempt to use the mechanism of DNA binding cooperativity as a basis. This is because p53 does not act as a monomer but binds to DNA as a tetramer in a sequence-specific manner, allowing a more efficient binding to its promoters and an enhanced transcriptional activity. Interactions within the DNA binding domains, which are mediated by the ionic interactions between the amino acid residues of the so-called H1 helix, are essential for a stable p53 DNA complex. In human p53 this H1 helix contains a glutamate in position 180 and an arginine in position 181 as well as two evolutionarily conserved serine molecules in positions 183 and 185 in the direct vicinity of the H1 helix.

Recent studies have shown that mutations in the H1 helix leading to loss of cooperativity can completely abolish p53 transcriptional functions, whereas weakened DNA binding cooperativity leads to a selective loss of apoptosis and directs transcriptional activity towards pro-senescence genes. On the contrary, enhanced DNA binding cooperativity results in a strong transcription of pro-apoptotic genes. In the question of whether the interaction between H1 helices can be influenced, the two serine molecules in positions 183 and 185 may play an interesting role. Phosphorylation of these amino acid residues could result in an enhanced negative charging of the H1 helix region due to the electromagnetic properties of phosphate groups, thus affecting DNA binding cooperativity. Some experimental data suggest that this enzymatic reaction at these serine residues is possibly mediated by Aurora kinases, in particular Aurora B.

To further investigate the role of phosphorylation of these serine residues for p53 functions, the cancer cell line HCT116 with *phospho-mimic* and *phospho-deficient* mutations at positions 183 and 185 was used in this work. Here, a significantly enhanced cell death of the *phospho-deficient* mutants could be observed under cytotoxic treatment with doxorubicin. Since the murine genome only contains one conserved serine residue in position 180, performing *in-vivo* experiments made the S180A mutant mandatory, where the serine residue in position 180 is changed to *phospho-deficient* alanine. Depending on the experimental set-up, significant differences between wildtype p53 and *phospho-deficient* p53 in tumor suppression and tumorigenesis were also shown in the *in-vivo* experiments.

Ultimately, taking influence on blocking the mentioned phosphorylation, for example by inhibition of the responsible kinases, could bring crucial benefit to the clinical treatment of cancer. Thus, kinase inhibitors could favorably affect the prognostically important functions of p53 in terms of tumor suppression and prevention of tumorigenesis by more intensively targeting cancer cells to apoptosis. Likewise, a reduced impact of cytotoxic therapy on healthy cells could be achieved by decreased DNA binding cooperativity therapeutically.

4 Einleitung

4.1 Krebserkrankungen und deren Entstehung

Krebserkrankungen stellen rund um den Globus eine enorme soziale, psychische und wirtschaftliche Belastung für die Gesellschaft dar. Weltweit erkranken jährlich über 18 Millionen Menschen an Krebs und über neun Millionen Menschen versterben daran (Ferlay et al., 2019). Dabei nehmen entscheidende Risikofaktoren wie das steigende Alter der Bevölkerung sowie Übergewicht und Rauchen kontinuierlich zu (Torre et al., 2015). In Deutschland machten bösartige Neubildungen im Jahr 2015 mit 24,5% die zweithäufigste aller Todesursachen aus, wobei Männer mit 27,3% im Gegensatz zu Frauen mit 21,7% etwas häufiger betroffen waren. Unter den Männern stellten die häufigste diagnostizierte Krebsart bösartige Neubildungen der Bronchien und der Lunge dar, während es bei den Frauen bösartige Neubildungen der Brustdrüse waren (Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2015). Grundsätzlich ist eine Unterscheidung zwischen gutartigen (benignen) Tumoren, die langsam und verdrängend wachsen, und bösartigen (malignen) Tumoren, die meist schnell und invasiv wachsen, notwendig. Die Tumorentstehung ist ein mehrstufiger Prozess (Barrett, 1993), bei dem im Genom einer Zelle über Jahre hinweg Mutationen akkumulieren, die sich in den verschiedenen Eigenschaften der sogenannten *Hallmarks of Cancer* widerspiegeln (siehe Abb. 1) (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Diese sind für die vollständige Transformation einer Zelle notwendig.

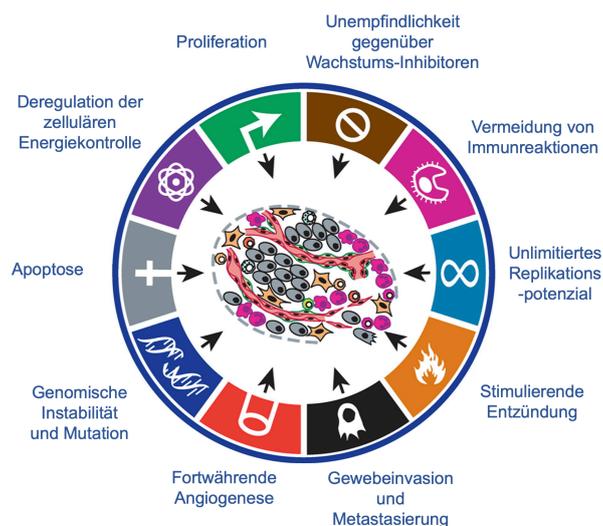


Abbildung 1: ‚Hallmarks of Cancer‘.

Die sogenannten *Hallmarks of Cancer* beschreiben die Grundvoraussetzungen zur malignen Entartung von Zellen. Modifiziert nach Hanahan & Weinberg (2011).

Bei der Tumorigenese lässt sich ein komplexes Wechselspiel zwischen Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen beobachten. Protoonkogene sind eukaryotische, stark konservierte Gene, die im physiologischen Zustand für die Zellproliferation und -differenzierung notwendig sind. Jedoch führen Amplifikationen, Punktmutationen, Deletionen oder chromosomale Translokationen zur Aktivierung des onkogenen Status dieser Gene, die dadurch in der Lage sind, eine maligne Transformation der betroffenen Zelle zu induzieren (Bell, 1988). Tumorsuppressorgene hingegen schützen das Genom, indem sie einen inhibitorischen Einfluss auf die Zellproliferation ausüben sowie Apoptose induzieren können. Sie können durch Missense- oder Nonsense-Mutationen, Deletionen, Insertionen oder epigenetische Modifikationen inaktiviert werden und somit die Tumorigenese fördern (Vogelstein & Kinzler, 2004). Das am häufigsten mutierte Tumorsuppressorgen *TP53* ist daher Gegenstand intensiver Forschung, um ein tieferes Verständnis der Tumorigenese zu erlangen und verschiedene Therapieansätze zu entwickeln.

4.2 p53 – Wächter des Genoms

Das Tumorsuppressorprotein p53 wurde während der Forschung an Viren mit transformierenden Eigenschaften im Jahr 1979 erstmals von Lane und Crawford als 53 kD schweres Protein beschrieben (Lane & Crawford, 1979). In den darauffolgenden Jahren rückte TP53 zunehmend in den Fokus der Krebsforschung. Es ist in über der Hälfte aller malignen Tumoren mutiert (Vogelstein et al., 2000) und damit das am häufigsten mutierte Gen in humanen Krebszellen (Vogelstein, 1990).

4.2.1 Struktur von p53

TP53 liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 und codiert für 393 Aminosäuren. Das Protein p53 besteht aus der N-terminalen Transaktivierungs-Domäne (TAD), einer anschließenden Prolin-reichen Domäne (PRD), der DNA-Bindungs-Domäne (DBD), der Oligomerisations-Domäne (OD) und der C-terminalen Domäne (CTD) mit Kernlokalisationsignalen (siehe Abb. 2) (Freed-Pastor & Prives, 2012; Joerger & Fersht, 2010).



Abbildung 2: Darstellung der p53-Proteindomänen.

Aufbau von p53 mit den begrenzenden Aminosäuren der einzelnen Domänen. Innerhalb der DBD ist die H1-Helix in gelb hervorgehoben. Modifiziert nach *Freed-Pastor & Prives (2012)*.

Bei der Transaktivierungs-Domäne werden zwei Sub-Domänen unterschieden (TAD1; AS 1-42 & TAD2; AS 43-61). Diese bestehen zum überwiegenden Anteil aus sauren Aminosäuren (Pennica et al., 1984), wobei in beiden TADs jeweils einige hochkonservierte, hydrophobe Aminosäuren essenziell für deren Funktion sind (Raj & Attardi, 2017). Die beiden TADs arbeiten hauptsächlich synergistisch, wobei die TAD1 eine größere Rolle in der Antwort auf akute DNA-Schäden spielt (Raj & Attardi, 2017). Die Funktion der TADs spiegelt die Bedeutung von p53 als Transkriptionsfaktor für diverse Zielgene wieder (Fields & Jang, 1990). Die nachfolgende PRD besteht aus fünf PXXP-Motiven (P = Prolin, X = beliebige AS) und ist zwar nicht zwingend notwendig zur generellen transkriptionellen Aktivität, trägt jedoch zur tumorsuppressiven Funktion von p53 bei (Walker & Levine, 1996).

Die zentrale DBD besteht aus einem β -Sandwich-Gerüst sowie einem *loop-sheet-helix-motiv* und zwei weiteren großen *loops* (L2 und L3) (Joerger & Fersht, 2010). Über 80% aller TP53-Mutationen sind in der DBD zu finden, wodurch dessen Bedeutung für die Forschung hervorgehoben wird (Olivier et al., 2002). Innerhalb von L2 befindet sich die kurze H1-Helix (AS 177-182 (Klein et al., 2001)), die nicht direkt an die DNA bindet, sondern eine entscheidende Rolle in der Protein-Protein-Interaktion im Sinne einer Homodimerisierung zwischen den DBD zweier p53-Moleküle darstellt (Cho et al., 1994). Neben der H1-Helix ist auch die OD von großer Bedeutung in der Ausbildung dieser Protein-Protein-Interaktionen, da sie für die Ausbildung der tetrameren Struktur von p53, bestehend aus zwei symmetrischen Dimeren (Homotetramer), verantwortlich ist (Cloure et al., 1994; W. Lee et al., 1994). Die CTD enthält zwei hoch-konservierte Regionen, die das Ziel von Acetyltransferasen und diversen Ubiquitin-Ligasen sind (Laptenko et al., 2016). Diese vermitteln neben der p53-Degradation auch eine nukleäre Translokation sowie die transkriptionelle Aktivierung bestimmter p53-Zielgene. Darüber hinaus unterstützt die CTD über mehrere positiv geladene Aminosäuren die Protein-DNA-Bindung durch unspezifische Bindungen mit dem positiv geladenen DNA-Rückgrat (Brooks & Gu, 2011).

4.2.2 Aufbau und Bedeutung des p53-DNA-Komplexes

Als Transkriptionsfaktor kann p53 die Expression seiner Zielgene aktivieren. Dafür bindet es über die DBD an Sequenz-spezifische *responsive elements* (RE), die sich in den Promotoren oder den ersten Introns des entsprechenden Gens befinden (Brady & Attardi, 2010). Die RE zeigen über alle p53-Zielgene hinweg eine konservierte Struktur aus zwei Kopien der folgenden dekameren Basensequenz: 5'- RRRCWWGYYY -3' (R = Purin, Y = Pyrimidin, W = Adenin oder Thymin). Zwischen diesen beiden Kopien liegt ein Platzhalter aus 0 bis 13 Basenpaaren (El-Deiry et al., 1992). Es binden jeweils zwei p53-Moleküle an ein RE, sodass bei zwei Kopien insgesamt vier p53-Moleküle zusammen als Tetramer an das Zielgen binden (Menendez et al., 2009). Dabei ist es notwendig, dass p53 in diesem tetrameren Komplex an die DNA bindet, weil ansonsten keine suffiziente Transkription induziert werden kann (Chan et al., 2004). Die verschiedenen Möglichkeiten der Basensequenz eines REs können zu Unterschieden in der DNA-Bindungs-Affinität bis zu einem Faktor von 50 führen (Weinberg et al., 2005). Innerhalb des dekameren REs hat die Sequenz 5'- CWWG -3' eine entscheidende Bedeutung für die Affinität von p53 zur DNA. Die höchste Bindungsaffinität ist zur CATG-Sequenz beschrieben worden, während die Affinität zu den anderen Sequenzen CAAG, CTAG und CTTG deutlich geringer ist (Jordan et al., 2008). Der Grund dafür liegt möglicherweise in einer erhöhten

Torsions-Flexibilität der CATG-Sequenz, sodass diese von p53 mit höherer Affinität gebunden werden kann als die anderen RE-Sequenzen (Beno et al., 2011). Die Stabilität des p53-DNA-Komplexes hängt somit einerseits von der Bindungsaffinität zum RE und andererseits von den Protein-Protein-Interaktionen zwischen den OD und den DBD der p53-Monomere ab. So wird die Tetramerisierung der p53-Moleküle zur Induktion der Zielgen-Transkription durch Interaktionen der C-terminalen OD vermittelt, während die Wechselwirkungen zwischen den benachbarten DBD den p53-DNA-Komplex weiter stabilisieren (Kitayner et al., 2006). Der Zusammenhang, dass eine verstärkte Interaktion der p53-Monomere zu einer intensivierten Induktion der Zielgen-Transkription durch ein p53-Tetramer führen, wird als DNA-Bindungs-Kooperativität bezeichnet (Schlereth et al., 2010). Die Relevanz dieser sogenannten DNA-Bindungs-Kooperativität zeigt sich in der Struktur der REs der p53-Zielgene (Weinberg et al., 2004). So weisen pro-apoptotische Gene vorzugsweise REs mit geringer Affinität (*low-affinity*) auf und pro-*survival* Gene weisen vorzugsweise REs mit hoher Affinität (*high-affinity*) auf (Weinberg et al., 2005). Die DNA-Bindungs-Kooperativität im Sinne der Protein-Protein-Interaktion wird durch Ionenbindungen zwischen den antiparallelen H1-Helices innerhalb des L2-loops einzelner p53-Monomere vermittelt. In dieser spielen die beiden gegensätzlich geladenen Aminosäuren Glutamat in Position 180 (E180) und Arginin in Position 181 (R181) eine entscheidende Rolle zur Ausbildung von p53-Dimeren (siehe Abb. 3) (Dehner et al., 2005). So resultiert aus der antiparallelen Anordnung der gegensätzlich geladenen Aminosäuren eine starke elektrochemische Wechselwirkung zwischen den H1-Helices zweier p53-Moleküle, die einen Teil der Grundlage der DNA-Bindungs-Kooperativität bildet.

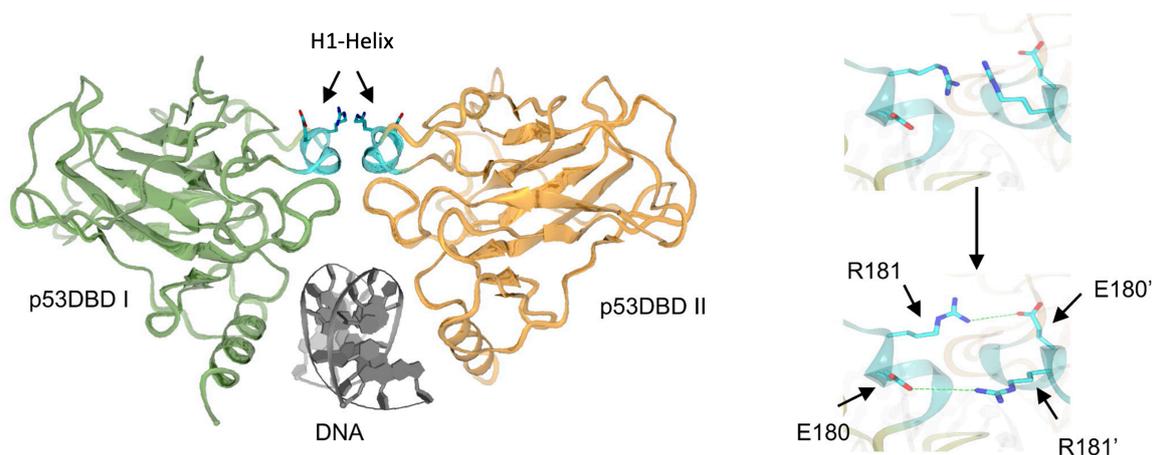


Abbildung 3: Die p53 H1-Helix ist von entscheidender Bedeutung für die DNA-Bindungs-Kooperativität.

Bei der Dimer-Bildung von zwei p53-Molekülen an der DNA gelangen die H1-Helices innerhalb der DBD in unmittelbare Nähe zueinander. Dabei sind die beiden Aminosäuren in Position 180 und 181 in der p53 H1-Helix aufgrund ihrer gegensätzlichen Ladung entscheidend für die DNA-Bindungs-Kooperativität. Modifiziert nach Schlereth et al. (2010).

In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die DNA-Bindungs-Kooperativität eine wichtige Rolle in der spezifischen Aktivierung von p53-Zielgenen spielt. Somit führt eine herabgesetzte elektrochemische Bindungsstärke zwischen den H1-Helices zweier p53-Moleküle dazu, dass weitaus weniger Zielgene aktiviert werden (Schlereth et al., 2013). Diese Gene, deren Promotoren *high-affinity* REs enthalten (z. B. bei *CDKN1A*), sind darüber hinaus einer bestimmten Gruppe von Zielgenen zuzuordnen, da sie überwiegend Zell-Zyklus- und Immunsystem-bezogene Funktionen aufweisen. Die Gene mit *low-affinity* REs in den Promotoren (z. B. *BAX* und *PUMA*) hingegen, die bei einer erhöhten DNA-Bindungs-Kooperativität durch verstärkte H1-Helix-Interaktion aktiviert werden, haben hauptsächlich pro-apoptische Funktionen (Beckerman & Prives, 2010). Demnach wurde auch gezeigt, dass eine erhöhte DNA-Bindungs-Kooperativität zu einer verbesserten Tumorsuppression *in-vivo* führt (Timofeev et al., 2013). Daraus ergibt sich die wichtige Fragestellung, ob die Entscheidung zwischen pro-Zell-Zyklus-Arrest (geringe Kooperativität) und pro-Apoptose (hohe Kooperativität) auf der Grundlage der H1-Helix-Bindungsstärke aktiv reguliert wird.

4.2.3 Bedeutung von Serin 183 und 185

Für die Fragestellung einer aktiven Regulierung der H1-Helix-Interaktionsstärke zeigen Untersuchungen der H1-Helix-Sequenz, dass diese hochkonserviert ist (Timofeev et al., 2020). Neben Glu180 und Arg181 sind die beiden Serin-Moleküle in Position 183 und 185 (entspricht im murinen Genom Ser180) in direkter Nachbarschaft zur H1-Helix von hoher Relevanz (siehe Abb. 4). Denn die Aminosäure Serin stellt häufig das Ziel von post-translationalen Modifikationen (PTM) in Form von Phosphorylierungen dar (DeHart et al., 2014, 2015) und bietet dadurch die Möglichkeit einer aktiven Regulierung durch Kinasen und Phosphatasen.

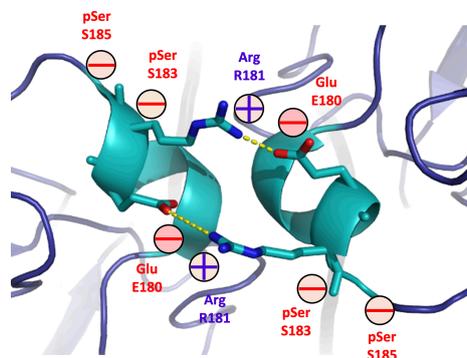


Abbildung 4: Lokalisation von Ser183 und Ser185 in der p53 H1-Helix.

In direkter Nachbarschaft zur humanen H1-Helix befinden sich zwei Serin-Moleküle, die das Ziel verschiedener post-translationaler Modifikationen sind. Modifiziert nach Oleg Timofeev.

Die generelle Bedeutung von PTMs wurde bereits in diversen Studien untersucht. So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass eine Deacetylierung von p53 durch Überexpression von Histon-Deacetylasen-assoziierten Proteinen in einer verminderten p53-vermittelten Induktion von Zell-Zyklus-Arrest und Apoptose resultiert (Luo et al., 2000). Ein weiteres Beispiel ist die Phosphorylierung von Ser15 durch ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) in Folge von DNA-Schäden. Dies hat eine verringerte Bindung von Mdm2 an die N-terminale TAD zur Folge, sodass die Degradation von p53 unterbunden wird (Khanna et al., 1998). Neben Einflüssen auf die Stabilisierung und Aktivierung von p53 wurden auch PTMs beschrieben, die möglicherweise in der Selektivität der p53-Zielgene eine Rolle spielen. So führt die Phosphorylierung von Ser46 durch verschiedene Kinasen zu einer selektiven Promotorbindung und zur spezifischen Induktion von pro-apoptotischen Genen (K. Oda et al., 2000). Da die DNA-Bindungs-Kooperativität wie zuvor beschrieben einen Einfluss auf die Zielgen-Selektivität hat, entstand daraus die Hypothese, dass die Phosphorylierung der beiden Serin-Moleküle in den Positionen 183 und 185 ebenfalls einen relevanten Einfluss auf die Zielgen-Selektivität hat. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass zumindest Ser183 in Säugetieren stark konserviert ist. Außerdem sind beide Aminosäuren in humanen Krebszellen äußerst selten mutiert (< 0,1% aller analysierten p53-Missense-Mutationen), sodass sie scheinbar keinen fördernden Effekt auf die zelluläre Transformation haben und ein Verlust vermutlich schädlich für die Tumorigenese wäre (Timofeev et al., 2020).

Es wurde außerdem von *Wu et al.* gezeigt, dass eine Phosphorylierung von Serin 183 durch die Kinase Aurora B die transkriptionelle Aktivität von p53 mindert. So unterstützt die Depletion von Aurora B vermutlich eine Dephosphorylierung von Serin 183 und führt so zu einem verstärkten p53-vermittelten Zell-Zyklus-Arrest und Apoptose. Weiterhin konnte mittels Luciferase-Reporter-Assay gezeigt werden, dass die Expression einer *phospho-mimic* Mutante verglichen mit Wildtyp-p53 zu einer schwächeren p53- und p21-Promotor-Aktivierung führt (L. Wu et al., 2011). Darüber hinaus scheint die Phosphorylierung von Serin 183 durch Aurora B zu einer verstärkten Ubiquitin-vermittelten p53-Degradation zu führen (Gully et al., 2012) und dadurch die Aktivität von p53 zu verringern.

4.2.4 Übersicht der Funktionen von p53

Zu den wichtigsten Funktionen von p53 gehört die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität, um Zellen vor der Entartung zu schützen oder bereits entartete Zellen zu eliminieren (Albrechtsen et al., 1999). Daher gehören vor allem die Induktion des Zell-Zyklus-Arrest bzw. der Seneszenz oder die Einleitung der Apoptose zu den Hauptaufgaben von p53. Daneben hat

p53 weitere Funktionen, um Zellen vor Genom-schädigenden Einflüssen zu schützen bzw. diese zu reparieren. Entscheidend ist dafür die Induktion verschiedener DNA-Schäden-Erkennungs- und -Reparaturenzyme. So ist p53 bei der Basen- und Nukleotidexzisionsreparatur sowie bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen maßgeblich beteiligt (Williams & Schumacher, 2016). Darüber hinaus schützt p53 die Zelle vor Schäden durch reaktive, oxidative Spezies (ROS), indem es antioxidative Gene wie *SESN1* und *SESN2* zur Suppression der Akkumulation von ROS aktiviert (Liu et al., 2008). Außerdem greift p53 über diverse Mechanismen in den Metabolismus ein, indem es zum Beispiel den metabolischen Aspekt der malignen Zelltransformation in Form des Warburg-Effekts beeinflussen kann. Dafür erfolgt eine Induktion von *TIGAR* zur Inhibition der Glykolyse und von *SCO2* zur Förderung der oxidativen Phosphorylierung (Vousden & Ryan, 2009). Darüber hinaus hat p53 einen wichtigen Einfluss auf die Autophagozytose. Diese vermittelt einen katabolen Signalweg zum Abbau langlebiger Proteine oder defekter Organellen (Aylon & Oren, 2016). Während die Bereitstellung von Aminosäuren und anderen Zellbestandteilen unter Nährstoff-Deprivation tumorsupportive Auswirkungen hat, kann eine besonders ausgeprägte Autophagie-Aktivität in Apoptose resultieren und damit eine tumorsuppressive Wirkung erzielen. Es überrascht daher nicht, dass p53 sowohl inhibitorische als auch aktivierende Einflüsse auf die Autophagie hat (Maiuri et al., 2010). Wie der Abbildung 5 entnommen werden kann und auch durch *M. Fischer* gezeigt wurde, ist p53 neben den aufgeführten Mechanismen an der Regulation von insgesamt über 100 Genen und diversen zellulären Prozessen beteiligt (M. Fischer, 2017; Kastenhuber & Lowe, 2017). Dadurch wird die zentrale Bedeutung von p53 als Tumorsuppressor, aber auch als genereller Transkriptionsfaktor deutlich.

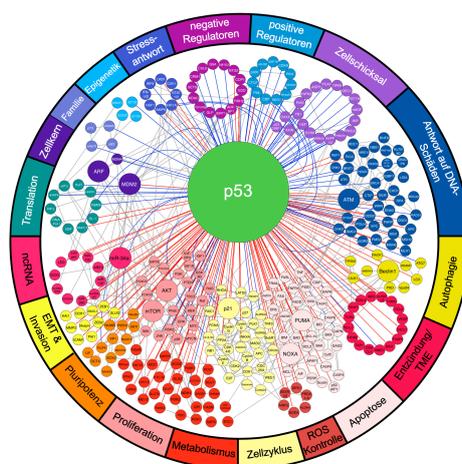


Abbildung 5: Übersicht des komplexen Netzwerks der p53-Funktionen.

Das Protein p53 ist an einer enormen Vielzahl an unterschiedlichen Mechanismen innerhalb der Zelle und des Gewebes maßgeblich beteiligt. Dabei beeinflusst es die Regulation von über 100 Genen. Modifiziert nach *Kastenhuber & Lowe (2017)*.

4.2.5 Regulation von p53 durch Mdm2

Das Tumorsuppressorgen *TP53* wird kontinuierlich exprimiert, wobei das p53-Proteinlevel im Normalzustand auf einem niedrigen, teils kaum detektierbaren Niveau gehalten wird (Kubbutat et al., 1997, S. 2). Dafür sind hauptsächlich die beiden Proteine Mdm2 und Mdmx (auch bekannt als Mdm4) verantwortlich, die teilweise als Heterodimer an p53 binden und sowohl die Proteinstabilität von p53 als auch dessen transkriptionelle Aktivität beeinflussen (siehe Abb. 6) (Tackmann & Zhang, 2017). Mdm2 kann als E3-Ubiquitin-Ligase an p53 binden und es somit für die proteasomale Degradation markieren (Beckerman & Prives, 2010). Mdm2 und Mdmx können beide auch direkt an die TAD von p53 binden, sodass die Transkription der p53-Zielgene inhibiert wird (Shvarts et al., 1996). Die transkriptionelle Aktivität kann weiterhin durch das Mdm2-vermittelte Ausschleusen von p53 aus dem Zellkern erfolgen, sodass der direkte Kontakt zu den Zielgenen verhindert wird (S. Wang et al., 2017). Das Protoonkogen *Mdm2* hingegen gehört auch zu den p53-Zielgenen, sodass p53 seine eigene Aktivität über einen negativen Feedbackmechanismus autoreguliert (Barak et al., 1993, S. 2). Entgegengesetzt der Wirkung von Mdm2 können die beiden Ko-Aktivatoren CPB/p300 ebenfalls an die TAD von p53 binden und so dessen transkriptionelle Aktivität verstärken (Vousden & Lu, 2002). Unter dem Einfluss verschiedener Stresssignale wie DNA-Schäden, Onkogen-Expression, Replikationsstress, Hypoxie, oxidativer Stress etc. (siehe Abb. 5) erfolgt eine Stabilisierung von p53 (Kastenhuber & Lowe, 2017). Dafür werden beispielsweise bei DNA-Schäden Enzyme aktiviert, die eine Phosphorylierung der TAD von p53 bewirken und somit die Bindung von Mdm2 blockieren (Shieh et al., 1997). Auf der anderen Seite wird durch onkogene Überexpression *INK4a* aktiviert und damit die Synthese des Tumorsuppressors $p19^{ARF}$ induziert, der Mdm2 direkt binden und inhibieren kann (Pomerantz et al., 1998). Durch diese Proteinstabilisierung kann p53 abhängig vom zellulären Stresssignal seine Bandbreite an Zielgenen aktivieren.

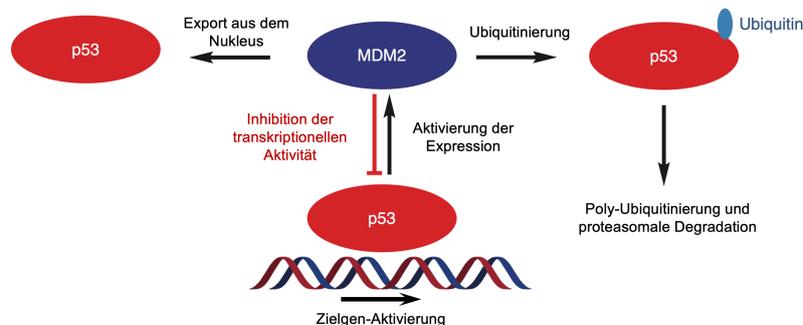


Abbildung 6: Überblick der p53-Regulation durch Mdm2.

Mdm2 kann über verschiedene Wege die transkriptionelle Aktivität von p53 inhibieren. Umgekehrt führt p53 zu einer verstärkten Expression von Mdm2. Modifiziert nach Wang et al. (2017).

4.2.6 Kontrolle des Zellzyklus durch p53

Die Effekte von p53 auf den Zellzyklus sollen etwas detaillierter beschrieben werden. Wenn die betroffene Zelle einem geringen Stresslevel, wie beispielsweise leichten DNA-Schäden, ausgesetzt ist, wird zunächst ein temporärer Arrest des Zell-Zyklus initiiert, damit DNA-Reparatur-Enzyme die Schäden beheben können (Brady & Attardi, 2010). Dafür werden diverse Tumorsuppressorgene aktiviert, wobei der CDK-Inhibitor CDKN1A (auch bekannt als p21) zu den Prominentesten gehört.

Dieser bindet an die CDK/Zyclin-Komplexe und inhibiert die Zyclin-abhängigen Kinasen CDK2, CDK3, CDK4 und CDK6 (Harper et al., 1995). Dadurch wird die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb-Protein) blockiert, sodass dieses verstärkt an E2F binden kann. Neben der Bildung des RB-E2F-Komplexes führt die Inhibition der CDKs durch p21 auch zur Ausbildung und Akkumulation des sogenannten DREAM-Komplexes. Beide Komplexe agieren als Regressor und hemmen durch spezifische Promotorbindung die Transkription der DNA-Replikations- und der Zellproliferations-Gene (Uxa et al., 2019). Die Folge ist ein vorübergehender Arrest in der G₁-Phase (Dick & Rubin, 2013). Ebenso führt die p53-vermittelte Aktivierung von *14-3-3σ* oder die Repression der Cdc25c-Phosphatase zu einem temporären Arrest am G₂/M-Übergang (Cann & Hicks, 2007; Clair et al., 2004).

Größere DNA-Schäden führen zu einer länger andauernden p53-Aktivierung, die wiederum in einer verlängerten und verstärkten *CDKN1A*-Expression resultiert. Dadurch wird die betroffene Zelle aus dem einfachen Zell-Zyklus-Arrest in den Zustand der Seneszenz überführt (Kim et al., 2017). Die Erstbeschreibung der Seneszenz geht auf Hayflick und Moorhead zurück (Hayflick & Moorhead, 1961), wobei heute zwei verschiedene Grundformen der Seneszenz unterschieden werden. Zum einen die replikative Seneszenz, die bei humanen und murinen Fibroblasten im Rahmen einer limitierten proliferativen Kapazität beschrieben wurde (Collado et al., 2007). Diese Form der Seneszenz wird auch in Verbindung mit zellulärer Alterung diskutiert (Harley et al., 1992; Ohmura & Oshimura, 1993; Shay & Wright, 2005). Zum anderen die stress-induzierte Seneszenz oder Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS) als tumorsuppressiver Mechanismus in prämaligen Phasen der Tumorigenese, nicht aber bei malignen Tumoren (Collado et al., 2005). Entgegen häufiger Beschreibungen als irreversibler Zustand ist durch eine p53-Inaktivierung der Wiedereintritt einer seneszenten Zelle in den Zell-Zyklus möglich (Beausejour, 2003). Im Rahmen der Seneszenz erfolgt eine stabile Repression der E2F-Zielgene durch das Rb-Protein und Heterochromatin-induzierenden Proteinen, die sich in den zugrundeliegenden Signalwegen deutlich vom Zell-Zyklus-Arrest unterscheidet (Narita et al., 2003). Somit wird durch den lang andauernden, stabilen Arrest seneszenten Zellen die

Proliferation prämaligener Zellen unterdrückt und die Transformation zu malignen Tumorzellen verhindert. Während dieses Arrests können diese prämaligen Zellen durch das angeborene Immunsystem erkannt und beseitigt werden, sodass eine Tumorregression resultiert (Xue et al., 2007).

4.2.7 Induktion von Apoptose durch p53

Neben der Arretierung des Zell-Zyklus ist die Induktion der Apoptose eine der Hauptfunktionen von p53. Diese wird als Antwort auf andauernde oder besonders schwere Stresssignale eingeleitet, bei denen eine erfolgreiche DNA-Reparatur nicht möglich ist. Apoptose, auch als programmierter Zelltod bekannt, ist durch eine Reihe an kontrollierten, biochemischen Prozessen gekennzeichnet. Sie ermöglicht die gezielte Elimination einer Zelle ohne das umgebende Gewebe wie bei der Nekrose-bedingten Inflammation zu schädigen (D'Arcy, 2019). Durch die eintreffenden Stresssignale wird p53 stabilisiert und kann diverse Gene aktivieren, die sowohl den intrinsischen als auch den extrinsischen Apoptoseweg initiieren (Brady & Attardi, 2010). Zur Aktivierung des extrinsischen Weges werden Fas und Dr5 (*death receptor*) p53-vermittelt aktiviert (Riley et al., 2008), die wiederum zu einer Dimerisierung des sogenannten Todesrezeptors führen. Dadurch erfolgt die katalytische Aktivierung der extrinsischen Initiator-Procaspase 8, die die gemeinsame Endstrecke der Apoptose einleitet (Jin & El-Deiry, 2005). Caspasen sind Cystein-Aspartat-Proteasen, die durch spezifische, katalytische Aktivität Einfluss auf apoptotische, aber auch diverse nicht-apoptotische Proteine haben (Shalini et al., 2015). Zur Einleitung des intrinsischen Weges verursacht p53 die Permeabilisation der äußeren Mitochondrienmembran (*mitochondrial outer membrane permeabilization* = MOMP) (Tait & Green, 2010). Für diesen Schritt ist ein Wechselspiel aus pro- und anti-apoptotischen Proteinen der Bcl2-Familie verantwortlich. Dazu gehören – neben vielen weiteren – die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bad, die durch Interaktion mit tBid und Bim aktiviert werden. Bax und Bad können durch Einlagerung in der äußeren Mitochondrienmembran Poren bilden und damit die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum ermöglichen (Kroemer et al., 2007). Cytochrom c bildet mit Apaf1, dessen Synthese ebenfalls durch p53 aktiviert wird, das Apoptosom. Dieses induziert die katalytische Spaltung der intrinsischen Initiator-Procaspase 9, welches wie die Caspase 8 die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 durch Katalyse aktiviert (Hill et al., 2004). Die Effektorcaspasen vermitteln durch die Aktivierung von Endonukleasen und Proteasen den Abbau der DNA sowie der zellulären Proteine. Dabei ist beispielsweise die *poly-(ADP-ribose) polymerase* (PARP) ein bekanntes Ziel der Caspase 3 und damit ein verlässlicher Marker der apoptotischen Aktivität

einer Zelle (Koh et al., 2005). Schließlich werden die verbliebenen, degradierten Zellbestandteile in Form von Apoptose-Körperchen abgeschnürt und von umgebenden Zellen abgeräumt (Elmore, 2007). Die anti-apoptotischen Proteine der Bcl2-Familie Bcl2, BclXL und Mcl1 verhindern die aktivierende Bindung von tBid und Bim an Bax und Bad (Chen, 2016). Durch p53-vermittelte Aktivierung von *NOXA* und *PUMA* wird diese inhibitorische Wirkung von Bcl2, BclXL und Mcl1 antagonisiert, sodass die pro-apoptotischen Signalwege überwiegen und der intrinsische Apoptoseweg eingeleitet wird (Chen, 2016). Im physiologischen Zustand herrscht ein Gleichgewicht zwischen den pro- und anti-apoptotischen Proteinen. Erst durch zunehmenden Zellstress und dadurch vermittelte p53-Aktivierung wird die Synthese von Apaf1, Bad, Bax, Puma, Noxa und vielen weiteren pro-apoptotischen Proteinen induziert und die Apoptose eingeleitet (Zilfou & Lowe, 2009).

Der entscheidende Einfluss von p53 auf die apoptotischen Signalwege wurde auch *in-vivo* durch *Puma*-null-Mäuse nachgewiesen, die eine deutlich geringere p53-vermittelte Apoptoserate zeigten (Jeffers et al., 2003). Darüber hinaus waren *Puma/Noxa*-doppel-null-Mäuse sogar noch Apoptose-resistenter, sodass ein kooperativer Effekt dieser Gene nahe liegt. Jedoch wurde auch gezeigt, dass diese Mäuse nur eine gering erhöhte Tumor-Suszeptibilität gegenüber p53^{WT}-Mäusen aufwiesen (Michalak et al., 2008). Wie *Timofeev et al.* allerdings auch nachweisen konnten, führt eine p53-Mutante mit eingeschränkter Kooperativität zu einem selektiven Verlust der apoptotischen Funktionen. Dies resultierte in einer höheren Tumor-Suszeptibilität dieser p53-Kooperativitäts-Mutanten (Timofeev et al., 2013). Somit scheint die tumorsuppressive Wirkung nur zu einem umschriebenen Teil von *PUMA* und *NOXA* abhängig zu sein, sodass auch einige andere p53-vermittelte Zielgene zur Induktion der Apoptose relevant sind.

4.3 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Als wichtigstes Tumorsuppressorgen vermittelt *TP53* im Rahmen der Antwort auf DNA-Schäden sowohl einen Zell-Zyklus-Arrest als auch Seneszenz und Apoptose. Allerdings ist es immer noch unklar, welche Mechanismen der Entscheidung zugrunde liegen, ob ein reversibler Zell-Zyklus-Arrest initiiert wird oder ob der programmierte Zelltod in Form der Apoptose eingeleitet wird. Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass die H1-Helix eine zentrale Rolle in dieser Entscheidungsfindung spielt. Hier konnte durch das Einbringen spezifischer Aminosäuren die Ionenbindung der Salzbrücke abgeschwächt werden. Daraus entstand eine verringerte Kooperativität, die in der stark reduzierten Aktivierung von pro-apoptotischen Genen und einer weiterhin intakten Aktivierung von Zell-Zyklus-Arrest-Genen resultierte (Schlereth et al., 2010). Diese Erkenntnisse konnten *in-vivo* im Sinne einer ausbleibenden apoptotischen Antwort auf DNA-Schäden und einer gleichzeitig erhöhten Tumorsuszeptibilität bestätigt werden (Timofeev et al., 2013). Umgekehrt konnte *in-vitro* eine erhöhte Apoptoserate festgestellt werden, wenn durch eine verstärkte Salzbrücke zwischen den H1-Helices die Kooperativität erhöht wurde (Schlereth et al., 2010).

Daraus entstand die Hypothese für diese Arbeit, dass durch die Phosphorylierung von Ser183/185 verhältnismäßig starke negative Ladungen in direkter Nähe zur positiv geladenen Aminosäure Arginin 181 eingebracht werden, die die ionische Bindung zwischen den H1-Helices abschwächt. In der Folge würde die DNA-Bindungs-Kooperativität herabgesetzt werden. Im Gegensatz dazu sollte im dephosphorylierten Zustand die maximale, endogene Kooperativität vorliegen, sodass die *low-affinity* REs am effizientesten gebunden werden können. In der daraus resultierenden Aktivierung der entsprechenden pro-apoptotischen Gene könnte p53 seine Funktion als Tumorsuppressor optimal entfalten.

Durch die Identifikation der zuständigen Kinase könnte durch die spezifische Blockade dieser eine klinische Tumorthherapie entwickelt werden. Demnach wurden in dieser Arbeit in humanen Kolonkarzinomzellen (HCT116) durch Missense-Mutationen hemizygoter *phospho-deficient* Mutanten mit einem Alanin statt Serin in den Positionen 183 und 185 ($p53^{-/AA}$) erzeugt. Ebenso wurde zum Vergleich eine hemizygoter *phospho-mimic* Mutante mit zwei Aspartat-Molekülen generiert ($p53^{-/DD}$). In diesen Krebszellen wurde die Reaktion in Bezug auf genotoxische Behandlungen verglichen, um potenzielle Erkenntnisse für die klinische Tumorthherapie zu gewinnen. Um die grundlegende Frage zu klären, ob das Fehlen der Phosphorylierung zu einer verbesserten Tumorsuppression *in-vivo* führt, wurden transgene Mäuse verwendet, die nur über ein Alanin in Position 180 (entspricht humanem Ser183/185) verfügen, nachfolgend als $p53^{SA}$ -Mäuse bezeichnet.

Die *phospho-deficient* und *phospho-mimic* Mutanten weisen vermutlich eine intakte Proteinfaltung auf, die bei p53-Missense-Mutationen häufig beeinträchtigt ist, da die Schmelztemperatur der aufgereinigten Proteine nahezu identisch war (Timofeev et al., 2020). Darüber hinaus wurden von Timofeev et al. erste *in-vitro* Analysen der beiden Mutanten durchgeführt. So konnten für p53^{-AA}- und p53^{-DD}-Proteine im zellfreien System mittels EMSA eine vergleichbare DNA-Bindungs Kapazität an *high-affinity* REs gezeigt werden, während die *phospho-deficient* p53^{-AA}-Proteine deutlich stärker an *low-affinity* REs binden konnten als die *phospho-mimic* p53^{-DD}-Proteine. Diese Ergebnisse wurden in einem *Luciferase-Reporter Assay* bestätigt, bei dem eine ektope Überexpression der Mutanten in p53-null Zellen durchgeführt wurde (Timofeev et al., 2020). Hier konnten sogar die *high-affinity* REs von den *phospho-deficient* Mutanten deutlich stärker transaktiviert werden.

Auf der Grundlage dieser Vorarbeiten wurden anschließend *in-vitro*-Versuche durchgeführt, um die Effekte der Phospho-Mutanten auf molekularbiologischer Ebene zu untersuchen. Dafür wurden isogene Zelllinien verwendet, bei denen p53^{-AA} bzw. p53^{-DD} vom endogenen Promotor der Phospho-Mutanten exprimiert wird, um die Hypothese in einem relevanteren Modell zu überprüfen. Dafür wurden die hemizygoten HCT116 p53^{-AA}- und p53^{-DD}-Zelllinien mit dem genotoxischen Anthrazyklin Doxorubicin behandelt, sodass das Zellverhalten und die p53-Antwort in den entsprechenden Zellen verglichen werden konnte. Die Apoptoserate der beiden Phospho-Mutanten unter genotoxischer Therapie wurde mithilfe durchflusszytometrischer Verfahren untersucht und die spezifische p53-vermittelte Genexpression darüber hinaus mittels q-RT-PCR und Western-Blot analysiert. Die Entstehung von Tumoren und deren Wachstum unterscheidet sich allerdings im lebendigen Organismus von dem Verhalten von Tumorzellen in einer Monokultur deutlich, da das umgebende Gewebe (das sog. Tumorstroma) intensiv mit den Tumorzellen interagiert. So führen sezernierte Botenstoffe des Tumorstromas sowie direkte Zell-Zell-Interaktionen zu einer Beeinflussung des Tumorgewebes. Die komplizierten Prozesse hinter der Tumorentstehung und dem Tumorwachstum im Organismus lassen sich daher verlässlicher in etablierten Versuchstierorganismen wie Mäusen oder Ratten nachweisen (Lipinski & Hopkins, 2004). Daher wurden *in-vivo* durch verschiedene Verfahren Tumoren in p53^{WT}- und p53^{SA}-Mäusen induziert, um die Tumorigenese und Tumorsuppression zu untersuchen. So wurden zum einen mit dem chemischen Karzinogen 3-Methylcholantren analog zu García-Cao et al. Fibrosarkome induziert (García-Cao et al., 2002). Zum anderen wurde durch eine intratracheale, adenovirale Infektion ein CRISPR/Cas9-Konstrukt zur Generierung des Onkogens *Eml4-Alk* in die Lungenepithelzellen von Mäusen eingebracht. Zur Auswertung der *in-vivo* Versuche wurden das tumorfreie und das Gesamtüberleben analysiert

sowie Chemo- und Biolumineszenzverfahren für vergleichende Verlaufskontrollen angewandt. Die Gewebeproben wurden anschließend histologisch und immunhistochemisch aufgearbeitet und sowohl deskriptiv als auch quantitativ analysiert.

5 Material

5.1 Lösungen, Puffer und Medien

5.1.1 Lösungen, Puffer und Medien für die Zellkultur

DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose by Gibco® (4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamine, 110 mg/L Sodium Pyruvate)	Invitrogen
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen
Fetal calf serum (FCS)	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA Solution (10x)	Sigma-Aldrich

Antibiotika, Antimykotika und andere Medikamente

Amphotericin B 250 µg/mL	Sigma-Aldrich
Chloroquin 100 mM	Sigma-Aldrich
Doxorubicin 50 µg/mL	Universitätsapotheker Marburg
Nutlin-3a 10 mM	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin Lösung (10.000 u/mL Penicillin, 10 mg/mL Streptomycin)	Sigma-Aldrich
RG7388 10 mM	MedChem Express

Reagenzien für Analysen mittels Durchflusszytometrie

Propidium-Iodid 2 mg/mL

5.1.2 Lösungen, Puffer und weitere Reagenzien für molekularbiologische Untersuchungen

Loading Buffer DNA IV (6x)	AppliChem
PCR Puffer Mix	ThermoScientific
dNTPs 10 mM	Stratagene
GO-Taq PCR Buffer (5x)	ThermoScientific

Enzyme

Taq-Polymerase 5 U/ μ L

NEB Q5 hot-start Polymerase 5 U/ μ L

1% TAE-Puffer

40 mM Tris-Acetat

1 mM EDTA

1% Agarosegel

0,5 g Agarosepulver

50 mL 1% TAE-Puffer

2,5 μ L RedSafe™

5.1.3 Lösungen, Puffer und weitere Reagenzien für die Proteinbiochemie

Methanol	Carl Roth GmbH
Milchpulver	Carl Roth GmbH
NuPAGE™ Antioxidans	Invitrogen
NuPAGE™ LDS-Probenpuffer (4x)	Invitrogen
NuPAGE™ MOPS SDS Laufpuffer (10x)	Invitrogen
NuPAGE™ Probenreduktionsmittel (10x)	Invitrogen
NuPAGE™ Transferpuffer (20x)	Invitrogen
Phosphostop	Roche
Ponceau S	AppliChem
Protease-Inhibitor (20x)	Roche
Protein-Assay Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Tween 20	AppliChem

5.1.4 Lösungen und Puffer für SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese und Western-Blot

RIPA Lysepuffer

150 mM NaCl

50 mM Tris-HCl pH 8,0

5 mM EDTA

1%	Nonidet P40
0,5%	Natriumdesoxycholat
0,1%	SDS

10x TBS pH 7.6

1,5 M	NaCl
0,5 M	Tris-HCl

TBS-T 0,1

1x	TBS pH 7,6
0,1%	Tween-20

5.1.5 Lösungen und Puffer für Immunfluoreszenz-Analysen

Fixierungs-Reagenzien

6%	Paraformaldehyd (PFA)
----	-----------------------

Blocking Buffer

0,1%	Nonidet-40
5%	FCS

Weitere Reagenzien

200 nM	DAPI
0,1 M	Glycin
0,1 mg/mL	Poly-L-Lysin

5.1.6 Lösungen und Puffer für die tierexperimentellen Methoden

Reagenzien zur Induktion von Fibrosarkomen im Rahmen der chemischen Kanzerogenese

10 mg/mL	3-Methylcholanthren (3-MC)
	steriles Sesamöl

Reagenzien zur Messung der Gaussia-Luciferase in Blutproben

200x	Coelenterazin
	PBS

Reagenzien zur Messung der Firefly-Luciferase im Biolumineszenz-Imaging

15 mg/mL D-Luciferin

Reagenzien zur Lysierung von tierischen Gewebeproben

PBND-Puffer

50 mM KCl

10 mM Tris-HCl

0,1 mg/mL MgCl₂

0,1 mg/mL Gelatine

0,45% Nonidet-40

0,45% Tween-20

20 mg/mL Proteinase K

Medikamente zur Durchführung von Narkosen

Analgetika und Anästhetika

500 µg/kg Medetomidin

200 mg/kg Metamizol

5 mg/kg Midazolam

50 µg/kg Fentanyl

Antagonisten

750 µg/kg Atipamezol

500 µg/kg Flumazenil

1,2 mg/kg Naloxon

5.1.7 Material für histologische Untersuchungen

Fixations-Lösung für Gewebeproben vor der histologischen Aufbereitung

4% Paraformaldehyd (PFA)

PBS

Lösungen und weitere Reagenzien zur Färbung der Gewebeschnitte

Dako Real TM Antibodydiluent	Carl Roth GmbH
Entellan®	Merck
Eosin 0,1%	Morphisto
H ₂ O ₂ 3%	Carl Roth GmbH
Isopropanol	Carl Roth GmbH
Mayers Hämalaunlösung	Merck
Roticlear®	Carl Roth GmbH
Streptavidinperoxidase 2 µg/mL	Medac

Tris-EDTA-Puffer pH 9,0

10 mM	Tris
1 mM	EDTA

Waschpuffer pH 7,6

1x	TBS
0,5%	Tween-20

5.2 Zelllinien

Bei der verwendeten Zelllinie HCT116 handelt es sich um humane, kolorektale Krebszellen, die ursprünglich zwei Kopien von Wildtyp-p53 trugen. Durch die Modifikation von Maria Klimovich (AG Stiewe) nach *Hsu et al.* (2014) entstand die hemizygoten Spock-Zelllinie (siehe Abb. 7). Bei dieser befindet sich in einem p53-Allel eine CRISPR/Cas9-vermittelte Deletion von 15 bp im Intron 5. Die daraus resultierende vollständige Inaktivierung eines der beiden Allele ist notwendig, um eine spätere Ko-Expression von WT-p53 neben dem gewünschten Mutant-p53 in einer Zelle zu verhindern. Im zweiten Allel wurden mittels Transfektion ein Puromycin-Resistenz-Gen sowie ein GFP-Gen, flankiert von zwei LoxP-Regionen, in das Intron 4 eingebracht. Das Puromycin-Resistenz-Gen wurde mittels CRISPR/Cas9 ausgeschaltet, sodass nach einer zweiten Transfektion mit dem gleichen Vektor, der die gewünschte Mutation im homologen Arm enthält, die Puromycin-Resistenz wiederhergestellt wurde. Dies ermöglicht die anschließende Selektion mit Puromycin, um die erfolgreich transfizierten Zellen herauszufiltern. Abschließend wurde durch eine Überexpression der Cre-Recombinase im Rahmen einer adenoviralen Infektion die LSL-Kassette entfernt und es resultiert eine GFP-negative, p53-hemizygoten Zelllinie mit der gewünschten Mutation in der H1-Helix ($p53^{-/AA}$ und $p53^{-/DD}$).

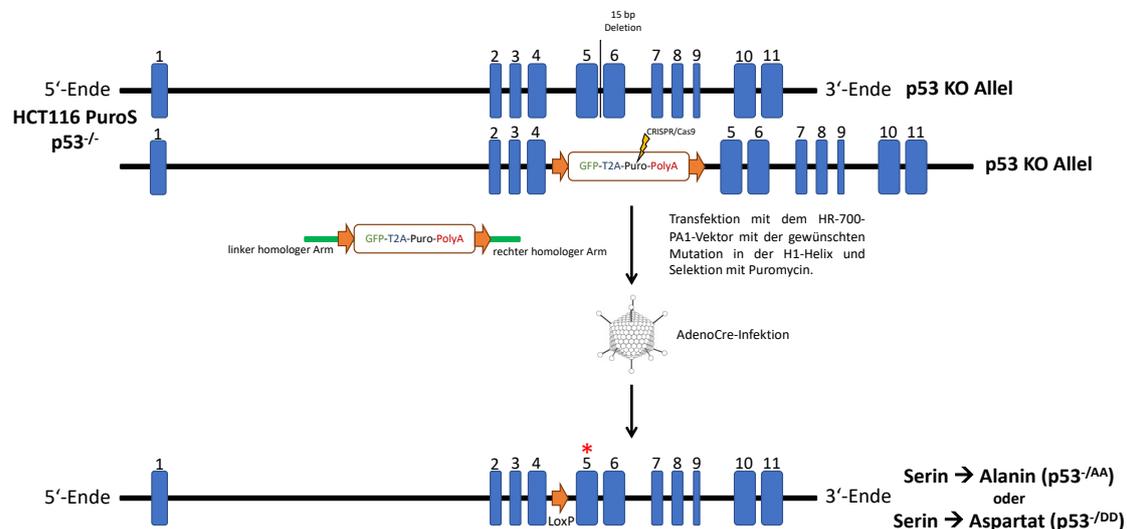


Abbildung 7: Generierung der HCT116 Spock-Zelllinie.

Dargestellt sind die beiden Allele der HCT116 PuroS $p53^{-/-}$ -Zelllinie. Durch die Transfektion mit dem HR-700-PA1-Vektor, der die gewünschte Mutation der Serin-Moleküle im rechten homologen Arm enthält, und einer anschließenden AdenoCre-Infektion entsteht die hemizygoten Spock-Zelllinie. Der rote Stern markiert die Stelle der gewünschten Mutation (Serin zu Alanin, bzw. Serin zu Aspartat) in Exon 5 im endogenen *TP53*-Genlocus. Modifiziert nach Maria Klimovich.

5.3 Mauslinien

Für den Versuch der chemischen Kanzerogenese wurden konditionale B6.129S/Sv-Trp53^{tm3Thst} Knock-In Mäuse generiert, die eine Punktmutation im Codon 180 (TCC>GCC) des endogenen TP53-Allels aufweisen. Das Gen-Targeting wurde von *Ingenious Targeting Laboratory* analog zu *Olive et al.* durchgeführt (Olive et al., 2004). Bei dieser Methodik findet eine Rekombination des endogenen TP53^{WT}-Allels mit einem TP53-Konstrukt statt, bei dem mittels *Site-directed mutagenesis* die gewünschte Mutation eingebracht wurde (siehe Abb. 8). Somit entstand aus dem phosphorylierbaren Serin ein *phospho-deficient* Alanin in Position 180. Dieses Konstrukt enthält außerdem eine LSL-Kassette, die die Expression des mutierten TP53-Allels blockiert und daher entfernt werden muss. Dafür wurden die heterozygoten p53^{+/LSL-S180A} mit Prm-Cre transgenen Mäusen (129S/Sv-Tg(Prm-cre)58Og/J) gekreuzt. Die Cre-Recombinase, exprimiert unter dem *Protamin 1*-Promotor, führte zur Exzision der LSL-Kassette in den männlichen Keimbahnzellen. Diese Tiere wurden anschließend mit weiblichen 129/Sv Wildtyp-Tieren gekreuzt, um heterozygote p53^{+/S180A}-Mäuse zu erzeugen. Diese Mäuse wurden schließlich untereinander gekreuzt, um homozygote p53^{S180A/S180A}-Mäuse (kurz p53^{SA}) und Wildtyp-Tiere als Kontrolle zu züchten.

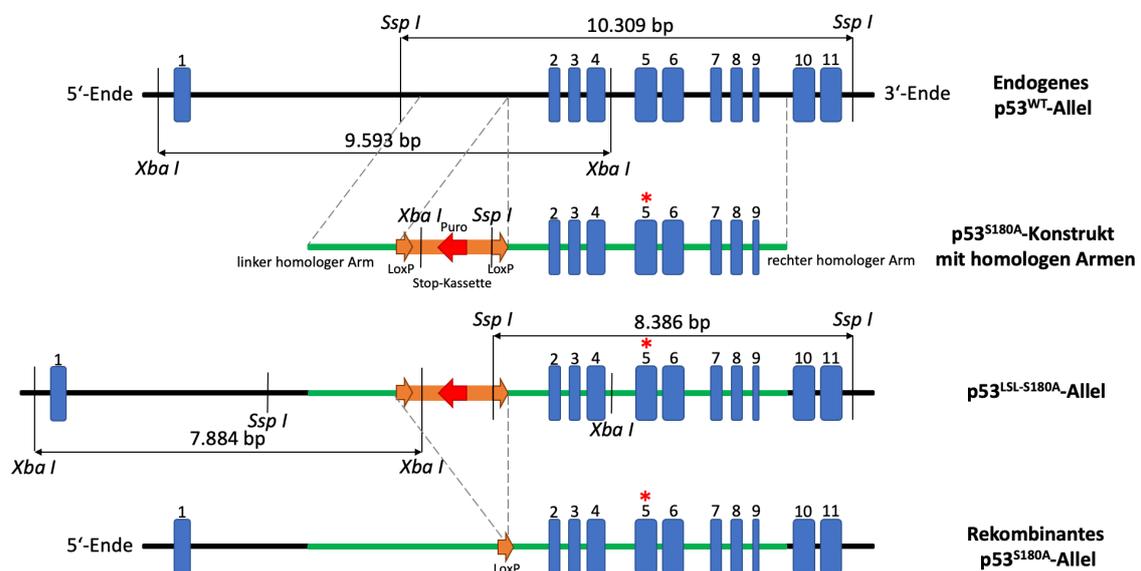


Abbildung 8: Gene Targeting zur Erzeugung eines endogenen, murinen TP53^{SA}-Allels.

Dargestellt ist das endogene, murine TP53^{WT}-Allel sowie das p53^{S180A}-Konstrukt, dass mittels Rekombination in den TP53-Genlokus eingebracht wird. Die erfolgreiche Rekombination kann durch einen Kontrollverdau bestätigt werden (Restriktionsstellen: Xba I und Ssp I). Nach der Rekombination wurde anschließend die LSL-Kassette mithilfe der Cre-Recombinase entfernt, sodass das rekombinante TP53^{S180A}-Allel im endogenen TP53-Genlokus entstand. Der rote Stern markiert die Stelle der gewünschten Mutation (Serin zu Alanin) in Exon 5. Modifiziert nach *Timofeev et al.* (2013).

Für den Versuch der CRISPR/Cas9-induzierten *Eml4-Alk*-positiven Lungentumoren (siehe Abschnitt 6.5.4) wurden heterozygote $p53^{+/S180A}$ -Mäuse mit $ROSA26^{LSL-GLuc}$ - oder $ROSA26^{LSL-FLuc}$ -Mäusen (B6.129-Gt(ROSA)26Sor^{tm2}(ACTB-Luc)^{Tyj/Nci}) gekreuzt. Anschließend wurden die Tiere untereinander gekreuzt, sodass folgende Kohorten entstanden: $p53^{S180A/S180A};ROSA26^{LSL-GLuc/LSL-FLuc}$ und $p53^{+/+};ROSA26^{LSL-GLuc/LSL-FLuc}$

Durch die intratracheale Infektion mit einem rekombinanten Adenovirus (Ad-Cas9-Cre-Eml4-Alk), der neben dem CRISPR/Cas9-Konstrukt zur Induktion des *Eml4-Alk*-Fusionsgens das Gen für die Cre-Recombinase enthält, konnte die LSL-Kassette schließlich entfernt und das *GLuc*- und *FLuc*-Gen exprimiert werden. Dabei codiert *GLuc* für die Gaussia-Luciferase, die von den erfolgreich infizierten Zellen ins Blut sezerniert wird, und *FLuc* für die Firefly-Luciferase, die innerhalb der betroffenen Zellen akkumuliert. Somit konnte sowohl die Tumorigenese als auch der Tumorprogress via Gaussia-assoziiertes Chemolumineszenz und Firefly-assoziiertes Biolumineszenz beurteilt werden.

5.4 Antikörper

Die nachfolgend aufgeführten Antikörper wurden für Western-Blot- und BD-Pathway-Analysen sowie für immunhistochemische Färbungen verwendet.

5.4.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung/Antigen	Typ	Verdünnung		
		Western Blot	BD-Pathway	IHC
β-Aktin	<i>mouse monoclonal</i>	1:10.000	-	-
p53 DO-1	<i>mouse monoclonal</i>	1:2.000	1:1.000	-
Mdm2 (Hybridom)	<i>mouse polyclonal</i>	1:2	-	-
p21	<i>mouse monoclonal</i>	1:200	-	-
cleaved PARP	<i>rabbit monoclonal</i>	1:1.000	-	-
Gaussia-Luciferase	<i>rabbit polyclonal</i>	-	-	1:1.000
Firefly-Luciferase	<i>goat polyclonal</i>	-	-	1:1.000
Ki-67 (Maus) IgG2a	<i>rat monoclonal</i>	-	-	1:75
Phospho-p44/42 MAPK	<i>rabbit monoclonal</i>	-	-	1:400

5.4.2 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung/Antigen	Typ	Verdünnung		
		Western Blot	BD-Pathway	IHC
Alexa Fluor 488 Anti-Mouse	<i>sheep</i>	1:5.000	-	-
Alexa Fluor 546 Anti-Mouse	<i>goat</i>	-	1:400	-
HRP Anti-Goat	<i>donkey</i>	-	-	1:500
HRP Anti-Rabbit	<i>goat</i>	1:5.000	-	1:500
HRP Anti-Rat	<i>rabbit</i>	-	-	1:500

5.5 Oligonukleotide

5.5.1 Oligonukleotide zur Analyse von humanem Genom

Bezeichnung	Verwendungszweck	Sequenz 5' → 3'
hGAPDH_qPCR_for2	q-RT-PCR	CTATAAATTGAGCCCCGCAGCC
hGAPDH_qPCR_rev2	q-RT-PCR	ACCAAATCCGTTGACTCCGA
RTp21_for	q-RT-PCR	TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA
RTp21_rev	q-RT-PCR	CCGGCGTTTGGAGTGGTA
hMdm2_qPCR_S	q-RT-PCR	CATGCAATGAAATGAATCCC
hMdm2_qPCR_AS	q-RT-PCR	GGAAGCCAATTCTCACGAAG
qRT PUMA for	q-RT-PCR	ACCTCAACGCACAGTACGAG
qRT PUMA rev	q-RT-PCR	GAGATTGTACAGGACCTCCA
RTbax_for	q-RT-PCR	TGTCGCCCTTTTCTACTTTGC
RTbax_rev	q-RT-PCR	GCCCATGATGGTTCTGATCAG
hNoxa_qPCR_99_S	q-RT-PCR	GCTGGAAGTCGAGTGTGCTA
hNoxa_qPCR_99_AS	q-RT-PCR	CCTGAGCAGAAGAGTTTGGA
HR_seq_205f	PCR	GGGTTGATTCCACACCCCCG
T7 Assay hp53_2 rev	PCR	GATGGTGGTACAGTCAGAGCC
Ex6-neu-for	Sequenzierung	GCCATCTACAAGCAGTCACAGC
exon6_PCR-rev	Sequenzierung	GCGGCTCATAGGGCACCACC

5.5.2 Oligonukleotide zur Analyse von murinem Genom

Bezeichnung	Verwendungszweck	Sequenz 5' → 3'
A-Eml4_for	q-RT-PCR & PCR	GCTCAAGAGGTGGGTTGTGT
B-Eml4_rev	q-RT-PCR & PCR	CAGGGCTGTGCCTAGATGAC
C-Alk_rev	q-RT-PCR & PCR	GTTTTACTGTGTTCAGAAAGGG
D-Alk_for	q-RT-PCR & PCR	GCAGCGGGGCTTCCGAAGGGGC

5.6 Adenoviren

Bezeichnung

AdCre

Ad-Cas9-Cre-Eml4-Alk

Herkunft

Labor Prof. Stiewe

Labor Prof. Stiewe

5.7 Größenstandards

Zur Einschätzung der Größe von aufgetrennten DNA-Fragmenten in Basenpaaren (bp) bei der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde der Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas) verwendet. Als Proteinlängenstandard zur Abschätzung der Größe von Proteinen in kDa in SDS-Polyacrylamidgelen wurde die PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet.

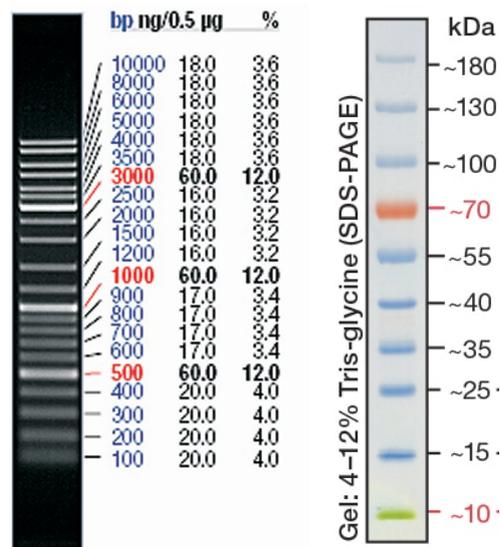


Abbildung 9: Größenmarker für die Gelelektrophorese (links) und für Western-Blot (rechts).

5.8 Kits

Annexin V Apoptosis Detection Kit

DAB-Plus Substrate Kit

peqGOLD Tissue DNA Mini Kit

RNeasy Mini Kit

SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit

SuperSignal™ West Dura Chemolumineszenz-Substrat

SYBR Green Jump Start Taq Ready Mix

MabTag

Invitrogen

Peqlab

Qiagen

Invitrogen

Thermo Scientific

Sigma

5.9 Verbrauchsmaterialien

Blottingpapier 580 x 600 mm, 1,2 mm dick	Kobe
Deckgläschen	Knittel Gläser
Einmalspritzen Omnifix ®-F 1 mL	Braun
FACS-Röhrchen	Greiner Bio-One
Falconröhrchen	Sarstedt
Filterspitzen	Sarstedt
Handschuhe	SemperCare
Sterican Kanülen für i.v.-Injektion	B. Braun Melsungen AG
Sterican Kanülen für i.p.-Injektion	B. Braun Melsungen AG
Kryogefäße	Greiner Bio-One
Küvetten	Biozym
Nitrocellulose Membran ECL Hybond	Amersham
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gele	Invitrogen
Objektträger	Roth
Pasteurpipetten	Otto E. Kobe KG
Pipettenspitzen	Sarstedt
Eppendorf Röhrchen	Sarstedt
Zellkultur Multiwell-Platten	Sarstedt
Zellkultur Schalen	Sarstedt

5.10 Laborgeräte

Absaugsystem BioChem-VacuuCenter BVC 21 NT	Vacuubrand
Accuri™ C6 Flow Cytometer	BD Biosciences
Aperio VERSA 8 Scanner	Leica
Autoklav Systec VE-150	Systec
BD Pathway™ Bioimager	BD Biosciences
Brutschrank/Inkubator Heraeus B6	Heraeus Instruments
Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Centrifuge 5424 R	Eppendorf
Centrifuge 5810 R	Eppendorf
Centrifuge miniSpin	Eppendorf
ChemiDoc™ Imaging System	BioRad
CO ₂ -Inkubator HERAcell 240i	Thermo Scientific
Cytation 3 Imaging Reader	BioTek
Eismaschine AF 20	Scotsman
Elektrophoresekammer Hoefer HE 33 Mini	Amersham
Elektrophoresekammer XCell4 Surelock™ Midi-Cell	Invitrogen
Gefrierschrank HERAfreeze	Thermo Scientific
Gel-Dokumentation mit UV-Transilluminator	Intas
IncuCyte S3	BioScience
In-Vivo Xtreme II Imaging System	Bruker
LightCycler® 480 Real-Time PCR System	Roche
Orion II Microplate Luminometer	TiterTek
Magnetrührer IKA RCT basic	IKA Labortechnik
Mikroliterpipetten Pipetman ®	Gilson
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss
Mikroskop Leica Ctr 6000	Leica
Mikroskop Leica DM IL LED	Leica
Mikrotom RM 2235	Leica
Mr. Frosty Gefrierbehälter	Thermo Scientific
MRT 7T Clinscan 70/30 USR	Bruker
PCR-System 9700 GeneAmp	Eppendorf
PCR-System Mastercycler Pro	Eppendorf
PCR-Werkbank Captair Biocap RNA/DNA	Erlab

PerfectBlue Tank Electro Blotter Web S
Pipettierhilfe Pipetboy acu
Pipettierroboter Microlab StarLet
PowerPac 200
Präzisionswaage 440-47
ProScan III
QIAcube
Rollenmischer RM 5
Schüttelplatte WT 12
Spektralphotometer NanoDrop ND1000
Stickstofftank Cryosystem 6000
Vortex-Genie 2
Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Biocel
Wasserbad
Zellkulturwerkbank MSC-Advantage
Z2 Coulter Particle Count and Size Analyser

Peqlab
Integra Biosciences
Hamilton
Biorad
Kern
Prior Scientific
Qiagen
CAT
Biometra
Peqlab
MVE
Scientific Industries
Millipore
Mettler
Thermo Scientific
Beckman Coulter

6 Methoden

6.1 Zellbiologische Methoden

6.1.1 Allgemeine Kultivierungsbedingungen

Die verwendeten Zelllinien wiesen alle ein adhärentes Wachstumsverhalten auf und wurden in Zellkultur-Schalen und -Multiwellplatten in Begasungsbrutschränken kultiviert. Die Temperatur innerhalb der Inkubatoren betrug konstant 37 °C und der CO₂-Gehalt lag bei 5% bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%. Als Kulturmedium wurde in der Regel DMEM verwendet, welches mit 10% FCS, 1% Pen/Strep (Penicillin 10.000 u/mL / Streptomycin 10 mg/mL) sowie 0,4% Amphotericin B (250 µg/mL) versetzt wurde. Bei allen Arbeiten mit kultivierten Zellen wurde unter sterilen Bedingungen innerhalb einer Zellkultur-Werkbank gearbeitet.

6.1.2 Auftauen von Zellen

Die verwendeten Zelllinien aus der Stiewe AG wurden in speziellen Kryogefäßen in einem Kryotank mit flüssigem Stickstoff gelagert. Die tiefgefrorenen Zellen befanden sich in einem Einfriermedium aus 90% FCS und 10% DMSO. Zum Auftauen wurden die Kryogefäße zunächst auf Eis und anschließend in ein etwa 37 °C warmes Wasserbad überführt. Um die Zellen von dem zytotoxischen DMSO zu reinigen, wurde der Inhalt des Kryogefäßes unter sterilen Bedingungen innerhalb der Zellkultur-Werkbank mit dem 10-fachen Volumen des Kulturmediums verdünnt. Daraufhin wurden die Zellen bei 300 xg und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der dabei entstandene zellfreie Überstand wurde mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt sowie das verbliebene Zellpellet in einem angemessenen Volumen des Kulturmediums resuspendiert. Danach wurde die Suspension in eine geeignete Zellkultur-Schale oder -Multiwellplatte gegeben und unter den oben beschriebenen Bedingungen kultiviert.

6.1.3 Passagieren von Zellen

Alle in Kultur befindlichen Zellen wurden in der Regel ein- bis zweitägig hinsichtlich eines konfluierenden Wachstums kontrolliert. Bevor die Zellen ein konfluentes Stadium erreicht hatten, wurden sie gesplittet. Dafür wurde zunächst das enthaltene Medium abgesaugt und die

Zellen mit etwa 5 mL PBS gewaschen. Zum Ablösen der adhären Zellen vom Boden der Kulturschalen wurde eine angemessene Menge Trypsin hinzugegeben (bspw. 0,5 mL von Trypsin 2x auf eine 10 cm Kulturschale). Nach einer Inkubation von wenigen Minuten in einem 37 °C warmen Inkubator wurden die abgelösten Zellen durch wiederholte Zugabe von 4,5 mL Kulturmedium gesammelt, um das Trypsin zu inaktivieren. Abschließend wurde eine geeignete Menge der Zellsuspension in einer neuen Kulturschale ausgesät, mit Kulturmedium auf das gewünschte Zielvolumen aufgefüllt und gleichmäßig verteilt.

6.1.4 Einfrieren von Zellen

Zur Überführung von Zellen in den Kryotank wurden diese so ausgesät, dass beim Einfrieren eine etwa 90%-ige Konfluenz vorlag. Die Zellen wurden analog zur Passagierung mit Trypsin abgelöst und in Kulturmedium gesammelt. Diese Zellsuspension wurde dann bei 300 xg und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert und der entstandene zellfreie Überstand abgesaugt. Schließlich wurde das Zellpellet in 1 mL des Einfriermediums (90% FCS, 10% DMSO) resuspendiert und in ein geeignetes Kryogefäß überführt. Zum schonenden Einfrieren wurde dieses Gefäß zunächst in einem Behälter (Mr. Frosty™), der nicht schneller als 1 °C/min abkühlt, in einem -80 °C kalten Gefrierschrank gelagert. Frühestens vier Stunden später wurden die eingefrorenen Zellen in einen Kryotank mit flüssigem Stickstoff überführt.

6.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Für die meisten durchgeführten Experimente musste zur optimalen Vergleichbarkeit mit definierten Zellzahlen gearbeitet werden. Die Zellzahl wurde dafür während des Passagierens bestimmt, nachdem die Zellen mit dem Kulturmedium gesammelt wurden. Dafür wurden Zählgefäße mit 10 mL Flüssigkeit gefüllt und anschließend 100 µL der Zellsuspension hinzugegeben. Der verwendete Partikelzähler hat die Menge von optischen Ereignissen registriert, zweimal gemessen und den resultierenden Mittelwert in Zellen/µL angegeben. Zur exakteren Bestimmung der Zellzahl (bspw. für Incucyte-Monitoring) wurde die Suspension nach dem Ablösen zunächst bei 300 xg und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet zunächst in 1 mL Kulturmedium resuspendiert, bevor die Suspension mit Kulturmedium auf insgesamt 10 mL aufgefüllt wurde. Anschließend wurden drei Proben jeder Zellsuspension mit dem Partikelzähler gemessen und der Mittelwert für weitere Berechnungen verwendet. Somit wurde eine gleichmäßigere Verteilung der Zellen in der Lösung ermöglicht sowie das Zusammenkleben von Zellverbunden verringert.

6.1.6 Adenovirale Infektion

Für die adenovirale Infektion wurden die entsprechenden Zellen am Vortag in *6-well-plates* ausgesät, sodass diese am Tag der Infektion eine geeignete Konfluenz aufwiesen. Zur Infektion wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und anschließend 400 µL DMEM ohne Antibiotika oder andere Zusätze zusammen mit der geeigneten Menge an Adenoviren vorsichtig in jedes Well gegeben. Die Multiwell-Platte wurde sofort und für die nächsten 30 Minuten im 10-Minuten-Rhythmus behutsam geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung des Mediums in jedem Well zu gewährleisten. Nach den 30 Minuten wurde Kulturmedium bis zum Maximalvolumen von 2 mL aufgefüllt. Anschließend wurde für einen Zeitraum von 48 Stunden gewartet, um dem Virus die Möglichkeit zur optimalen Infektion zu geben; danach wurde das Kulturmedium ausgetauscht. Bei der Infektion von HCT116-Zellen mit dem AdCre-Virus wurde die Effizienz durch den Verlust der GFP-positiven Signale im Fluoreszenz-Mikroskop und in der Durchflusszytometrie beurteilt.

6.1.7 Auswahl von Einzelzellklonen nach adenoviraler Infektion

Um nach einer adenoviralen Infektion mit ausschließlich erfolgreich transformierten Zellen weiterzuarbeiten, wurden Einzelzellklone ausgewählt. Dafür wurden 300 bis 500 Zellen etwa eine Woche nach der Infektion in 15 cm Kulturschalen ausgesät. Bei der Infektion von HCT116-Zellen mit dem AdCre-Virus war das Verschwinden des GFP-Signals der entscheidende Effizienzmarker, sodass GFP-negative Klone, die aus etwa 50 Zellen bestanden, ausgewählt wurden. GFP-negative Klone wurden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop bestimmt und anschließend unter mikroskopischer Sicht mit einer 10 µL-Pipette vom Boden abgelöst und in eine *96-well-plate* übertragen. In die Wells der *96-well-plate* wurden zuvor jeweils 100 µL des Kulturmediums gegeben. Einen Tag nach der Auswahl der Einzelklone wurde das Kulturmedium getauscht und der FCS-Gehalt von 10% auf 20% erhöht, um das Wachstum der ausgewählten Zellen zu beschleunigen.

6.1.8 Incucyte-Monitoring

Zur Analyse von Echtzeit-Daten lebender Zellen unter verschiedenen zytotoxischen Behandlungen wurde das IncuCyte-Monitoring mit dem IncuCyte S3 verwendet. Hierfür wurden die zu analysierenden Zellen zunächst standardmäßig geerntet und die Zellzahl nach der exakten Zählmethode (siehe 6.1.5) bestimmt. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden 3.000 Zellen/Well ausgesät und zunächst bei Raumtemperatur unter dem Abzug der Werkbank

inkubiert, bis die Zellen in einer gleichmäßigen Verteilung adhärent zum Boden waren. Nach einer 24-stündigen Ruhezeit im Inkubator, begann am nächsten Tag die Behandlung mit 0,25 µg/mL Doxorubicin. Zur Analyse der Zellproliferation wurde die verwendete 96-*well-plate* in das IncuCyte S3-System gestellt, welches sich in einem Inkubator mit Standardbedingungen befand. Die Multiwell-Platte wurde in einem 4-stündlichen Rhythmus mit 10-facher Vergrößerung gescannt. Die Maske zur optimalen Analyse von lebenden Zellen wurde über mehrere Versuche entwickelt, um eine zuverlässige Berechnung durch das Programm gewährleisten zu können.

6.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Zur Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA wurde das Nanodrop ND1000 Spectrophotometer verwendet. Vor der Messung wurde zunächst ein Kalibrierungsvorgang mit 1 μL H_2O durchgeführt und anschließend 1 μL der zu messenden Probe auf den Probenhalter gegeben. Der Gehalt an Nukleinsäuren in $\text{ng}/\mu\text{L}$ wurde anschließend über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

6.2.2 Isolation von RNA

Bei der Isolation von RNA wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Die Zellen, aus denen die RNA gewonnen werden sollte, wurden wie oben beschrieben geerntet und das Zellpellet in 600 μL RLT-Lysepuffer lysiert und homogenisiert. Anschließend erfolgte die RNA-Isolation entsprechend der Herstellerangaben im QIAcube. Die isolierte RNA wurde schließlich in 50 μL RNA-freiem H_2O diluiert und bei -80°C gelagert.

6.2.3 Synthese von cDNA

Für weitergehende RNA-Analysen mithilfe q-RT-PCR musste die RNA zunächst in doppelsträngige cDNA umgeschrieben werden. Dafür wurde RNA aus den entsprechenden Zellen nach oben beschriebenem Schema isoliert und – falls zuvor bei -80°C gelagert – langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde aus der RNA mit dem SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit von Invitrogen nach Herstellerangaben cDNA synthetisiert. Die gewonnene cDNA wurde schließlich in 150 μL RNA-freiem H_2O diluiert und bis zur Verwendung für q-RT-PCR-Analysen bei -20°C gelagert.

6.2.4 Quantitative reverse transcription PCR

Die *quantitative reverse transcription polymerase-chain-reaction* (q-RT-PCR) dient dem Nachweis und quantitativem Vergleich spezifischer Nukleinsäurefragmente. Zu diesem Zweck wird bei der *in-vitro*-Amplifikation des ausgewählten DNA-Fragments ein fluoreszierender Interkalator wie SYBR® Green verwendet, dessen Fluoreszenzsignal proportional zur Menge des PCR-Produkts ansteigt. Ebenso wird als Referenz ein sogenanntes *housekeeping gene* (HKG) wie *GAPDH* amplifiziert, um anschließend eine relative Quantifizierung

durchzuführen. Somit kann auf die ursprüngliche Menge verschiedener RNA-Moleküle, die zuvor in cDNA umgeschrieben wurden, rückgeschlossen werden und die Genexpression unter verschiedenen Bedingungen beurteilt werden.

Bei der q-RT-PCR wurde zunächst eine Reaktionslösung angefertigt, die sich für jede Probe wie folgt zusammensetzte:

3 µL	cDNA-Template
5 µL	2x SYBR® Green Mix
0,5 µL	Sense-Primer (0,2 µM)
0,5 µL	Antisense-Primer (0,2 µM)
1 µL	H ₂ O

Der Pipettiervorgang wurde mithilfe des Microlab StarLet Pipettierroboters von Hamilton in einer 384-*well-plate* durchgeführt. Anschließend wurde die q-RT-PCR im LightCycler® 480 Real-Time PCR System von Roche mit folgendem Programm durchgeführt:

1. Denaturierung für 120 s bei 94 °C
 2. Denaturierung für 20 s bei 94 °C
 3. Annealing für 20 s bei ~ 60 °C
 4. Elongation für 20 s bei 72 °C
 5. Kühlung für ∞ s bei 4 °C
- } 40 Zyklen

Die Annealing-Temperatur wurde in Abhängigkeit von dem verwendeten Primerpaar teilweise modifiziert.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte in Bezug auf *GAPDH* als HKG als relative Quantifizierung mit der $\Delta\Delta Ct$ -Methode. Der Ct-Wert (*Cycle threshold*) beschreibt die Anzahl an Zyklen, die notwendig ist, um einen definierten Schwellenwert zu überschreiten. Bei diesem Schwellenwert überschreitet das Fluoreszenzsignal in den amplifizierten Templates erstmals das ubiquitäre Hintergrundsignal. Zur Berechnung des quantitativen Unterschieds in der Expression einzelner Gene wird zunächst die Differenz zwischen dem Ct-Wert der untersuchten Probe und dem Ct-Wert des HKGs berechnet:

$$\Delta Ct_{probe} = Ct_{Zielgen} - Ct_{HKG}$$

Anschließend wird die Differenz zwischen dem ΔCt -Wert der Probe und dem ΔCt -Wert der NTC (*non template control*) berechnet:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{probe} - \Delta Ct_{NTC}$$

Für die Analyse mit Microsoft Excel wird der $\Delta\Delta Ct$ -Wert mit folgender Formel in lineare Werte umgewandelt:

$$x = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

6.2.5 Isolation von genomischer DNA

Für molekularbiologische Untersuchungen des Genoms aus eukaryotischen Zellen oder Geweben wurden diese mithilfe des peqGOLD Tissue DNA Mini Kits von Peqlab nach Angaben des Herstellers zunächst lysiert und anschließend die genomische DNA (gDNA) isoliert. Die isolierte gDNA wurde schließlich in 200 μL Elution Buffer diluiert und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

6.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zum Nachweis spezifischer DNA-Fragmente wurden diese mittels PCR amplifiziert. Dabei wird die DNA-Probe mit einem Primerpaar, welches spezifisch für den zu untersuchenden Genabschnitt ist und diesen flankiert, einer DNA-Polymerase und Desoxy-Nukleotidtriphosphaten (dNTPs) in einer Pufferlösung versetzt.

Bei der PCR wurde zunächst eine Reaktionslösung angefertigt, die sich für jede Probe wie folgt zusammensetzt:

1 μg	DNA-Template
0,2 μL	NEB Q5 hot-start polymerase
1 μL	Sense-Primer (0,5 μM)
1 μL	Antisense-Primer (0,5 μM)
4 μL	PCR-Puffer
0,4 μL	dNTPs (0,2 mM)
H ₂ O bis zu einem Gesamtvolumen von 20 μL	

Die Proben wurden in eine 96-well-plate pipettiert und anschließend wurde die PCR im Mastercycler Pro oder im GeneAmp PCR-System 9700 von Eppendorf durchgeführt. Dabei wurde für den Nachweis des *Eml4-Alk*-Fusionsgens das folgende Programm ausgewählt:

1. Denaturierung für 120 s bei 98 °C
 2. Denaturierung für 30 s bei 98 °C
 3. Annealing für 30 s bei 65 °C
 4. Elongation für 40 s bei 72 °C
 5. Denaturierung für 20 s bei 98 °C
 6. Annealing für 30 s bei 62 °C
 7. Elongation für 40 s bei 72 °C
 8. Abschließende Elongation für 180 s bei 72 °C
 9. Kühlung für ∞ s bei 4 °C
- } 6 Zyklen mit -0,5 °C pro Zyklus
- } 35 Zyklen

Zur Visualisierung wurden die Proben nach der PCR in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt 6.2.7).

6.2.7 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente, die im Rahmen einer PCR amplifiziert wurden, können anschließend in einem Agarosegel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Dafür wird eine elektrische Spannung angelegt, sodass die negativ geladene DNA zur positiv geladenen Anode wandert. Je größer das amplifizierte DNA-Fragment ist, desto langsamer wandert es durch das Gel in Richtung der Anode. Mithilfe eines Fluoreszenzmarkers und eines Größenstandards können anschließend die DNA-Fragmente gemäß ihrer Größe identifiziert werden.

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurde zunächst 1% Agarosepulver mit TAE-Puffer versetzt und aufgeköcht. Unter kontinuierlichem Rühren auf einem Magnetrührer kühlte die Lösung ab. Außerdem wurde Red Safe™ hinzugegeben, welches sich als Interkalator zwischen die Basenpaare der DNA einlagert und unter ultraviolettem Licht fluoresziert. Das abgekühlte, noch flüssige Gel wurde anschließend in eine Gelkammer mit einem eingesetzten Kamm gegeben, der zur Aussparung der Probenaschen diente. Nachdem das Gel vollständig abgekühlt und fest geworden war, wurde es in eine Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer gegeben. Der Kamm wurde entfernt und die mit Ladepuffer versetzten DNA-Proben sowie der Größenstandard wurden in die Probenaschen gefüllt. Schließlich wurde eine Spannung von etwa 90 mV angelegt. Anhand der Ladepuffers wurde überprüft, wie weit die Proben bereits

durch das Gel gewandert sind. Nach etwa 30 bis 45 Minuten wurde das Gel der Elektrophoresekammer entnommen und in den Transilluminator von Intas gelegt. Hier wurden dann die DNA-Fragmente mit UV-Licht durch das Red Safe™ sichtbar gemacht.

6.2.8 Probenvorbereitung für Sequenzierungsanalysen

Zum Nachweis der korrekt eingebrachten Mutation in *TP53* der HCT116-Zellen wurde eine Sequenzierung durch die Firma *LGC Genomics* durchgeführt. Aus der DNA der zu untersuchenden Proben wurde *TP53* bereits durch eine PCR amplifiziert. Anschließend wurde folgender Ansatz pro Probe zu *LGC Genomics* nach Berlin geschickt:

10 µg	DNA-Template
2 µL	Sense-Primer (5 pM)
2 µL	Antisense-Primer (5 pM)
H ₂ O bis zu einem Gesamtvolumen von 14 µL	

Die DNA der eingeschickten Proben wurde von *LGC Genomics* sequenziert und die Ergebnisse wurden anschließend zur Verfügung gestellt.

6.2.9 Zell-Bioimaging via BD Pathway™-Analyse

Für die Beurteilung der p53-Expression und der subzellulären Lokalisation in AdCre-infizierten HCT116-Zellen wurde eine p53-Immunfärbung durchgeführt und mittels BD Pathway™ analysiert. Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst wie oben beschrieben geerntet und gezählt. Eine schwarze 96-well-plate wurde mit 50 µL Poly-L-Lysin (0,1 mg/mL) je Well gefüllt und für eine Stunde inkubiert, um die Zelladhärenz zu verbessern. Anschließend wurden alle Wells zweimal mit PBS gewaschen und 5.000 Zellen in 100 µL Kulturmedium pro Well ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Kulturmedium ausgetauscht, sodass anschließend bei jeweils drei Replikaten normales Kulturmedium vorlag und bei weiteren drei Replikaten Kulturmedium mit 10 µM Nutlin. 24 Stunden nach Beginn der Behandlung wurde das Kulturmedium verworfen und 50 µL 1,5%iges PFA zu jedem Well hinzugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde das PFA entfernt und anschließend fanden zwei Waschvorgänge mit PBS statt. Danach wurden jeweils 50 µL PBS zu den Zellen gegeben und die 96-well-plate bis zur Immunfärbung bei 4 °C gelagert.

Für die Immunfärbung wurden die Zellmembranen zunächst mit 0,1% TRITON X-100 in PBS für zehn Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert und zweimal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen an freien Aldehydgruppen zu vermeiden, wurden die Zellen anschließend in 0,1 M Glycin in PBS ebenfalls für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Vermeidung sonstiger unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Zellen danach in Blocking Buffer für 45 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Daraufhin folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper DO-1 gegen p53 für 45 Minuten bei 37 °C. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1% NP-40 in PBS fand die Färbung mit dem sekundären Antikörper α -mouse A546 für 45 Minuten bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurden 200 nM DAPI zu den Wells gegeben. DAPI bindet als Fluoreszenzfarbstoff besonders stark an Adenin-Thymin-reiche Regionen der DNA. Somit lässt sich später der Zellkern mittels Immunofluoreszenz darstellen. Schließlich wurden die Wells dreimal mit 0,1% NP-40 in PBS gewaschen, bevor die Analyse mittels BD Pathway™ nach Herstellerangaben stattfand.

6.3 Proteinbiochemische Methoden

6.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur proteinbiochemischen Analyse von kultivierten Zellen nach verschiedenen Behandlungen wurden Zelllysate hergestellt. Dabei wurden alle notwendigen Schritte auf Eis durchgeführt, um eine verbesserte Proteinstabilität zu gewährleisten. Die Zellen wurden nach entsprechender Behandlungsdauer oder Erreichen einer Konfluenz von etwa 90% wie oben beschrieben geerntet und für fünf Minuten bei 300 xg und 4 °C zentrifugiert. Nach einem Waschvorgang mit PBS und erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in einer angemessenen Menge RIPA-Lysepuffer mit Phosphatase- und Protease-Inhibitoren resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben zur Abtrennung nicht lysierter Zellbestandteile für zehn Minuten und 4 °C bei 16.000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde schließlich in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

6.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Um die Konzentration der Proteine in den Zelllysaten zu messen, wurde das Bradford-Reagenz verwendet, welches einen Komplex mit Proteinen bildet. Durch diese Komplexbildung kommt es zur Verschiebung des Absorptionsmaximums aus dem roten Spektrum von 470 nm zum blauen Farbspektrum bei einer Wellenlänge von 595 nm. Zur Messung wurde jeweils 1 µL des Lysats zu 400 µL H₂O und 100 µL der Bradford-Lösung gegeben. Ebenso wurden zur Erstellung einer Standardkurve vier weitere Proben mit 0 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL und 4 µg/mL gemessen. Durch die gemessene Extinktion konnte in Bezug auf die Standardkurve die Proteinkonzentration in den Proben bestimmt werden. Alle Messungen wurden zur verbesserten Genauigkeit in Dreifachbestimmung durchgeführt.

6.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe der SDS-PAGE können Proteine aus den zuvor erstellten Zelllysaten in einem elektrischen Feld entsprechend des Molekulargewichts aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Dafür wurden die Proben zunächst mit 4x NuPAGE™ LDS-Probenpuffer und 10x NuPAGE™ Reducing Agent versetzt und für zehn Minuten bei 70 °C inkubiert. Das enthaltene SDS ist ein anionisches Reagenz, das zur Denaturierung der Proteine führt. Gleichzeitig bindet es hochaffin an Proteine und kann so mit seiner negativen Eigenladung die elektrische Ladung der Proteine überlagern. Das ebenso enthaltene β-Mercaptoethanol löst die verbliebenen

Disulfidbrückenbindungen zwischen den Proteinen auf, sodass diese überwiegend in ihrer Primärstruktur vorliegen. So ist es möglich, die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts unabhängig von ihrer Eigenladung und Protein-Protein-Wechselwirkungen in einem elektrischen Feld aufzutrennen.

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurden NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris-Proteingele von Invitrogen in die Elektrophoresekammer eingebaut, der Kamm entfernt und die Kammer anschließend mit NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer befüllt. Anschließend wurde 1 mL des NuPAGE™ Antioxidans pro Kammer hinzugegeben, um zu gewährleisten, dass die Proteine im reduzierten Zustand verbleiben. Mit einer Spritze wurde SDS-Puffer aus der Kammer aspiriert und vorsichtig in die einzelnen Probestaschen gespritzt. Schließlich wurden 5 µL des Protein-Größenstandards und je 15 µL der vorbereiteten Proteinproben in die Taschen gefüllt und die Elektrophorese bei 150 V für 60 bis 120 Minuten durchgeführt. Es wurde jeweils eine Proteinmenge von mindestens 20 µg aus den zuvor gewonnenen Zellysaten verwendet. Die separierten Proteine wurden nach der Elektrophorese mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

6.3.4 Western-Blot und Immundetektion

Nach der erfolgten SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Auf der Membran sind die Proteine anschließend für die immunochemische Detektion durch spezifische Antikörper zugänglich.

Zunächst wurden die Blotting-Kassetten in folgender Reihenfolge luftblasenfrei beladen: Anode – Schwamm – Blotting Papier – Nitrocellulosemembran – SDS-Gel – Blotting Papier – Schwamm – Kathode. Mit Ausnahme des Gels wurden alle Bestandteile zuvor in Transfer Buffer mit 10% Methanol getränkt. Die beladenen Kassetten wurden anschließend in die Transferkammer eingebaut und diese mit NuPAGE™ Transfer Buffer mit 10% Methanol befüllt. Außerdem wurde ein Kühlakku sowie ein Rührfisch in die Kammer gegeben, um eine konstant niedrige Temperatur und gleichmäßige Pufferkonzentration zu gewährleisten. Der Transfer wurde für etwa eine Stunde bei 4 °C und einer senkrecht zum Gel angelegten Spannung von maximal 100 V durchgeführt.

Nach dem erfolgten Transfer wurde zum Nachweis der erfolgreichen Übertragung der Proteine von dem SDS-Gel auf die Nitrocellulosemembran eine Ponceau S-Färbung durchgeführt. Ponceau S ist ein roter Azofarbstoff, der reversibel an positiv geladene Aminogruppen bindet und somit Proteine auf der Membran nachweist. Anschließend wurde der Farbstoff mit Wasser vorsichtig abgewaschen und die Nitrocellulosemembran wurde zur Vermeidung unspezifischer

Antikörper-Bindungen in einer 5%-igen Milch in TBS-T-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Schüttelplatte oder in einem 50 mL-Falcon auf dem Rollenmischer inkubiert und somit blockiert. Danach wurde der gewünschte Primärantikörper in geeigneter Konzentration ebenfalls in 5%-iger Milch in TBS-T-Lösung zu der Membran gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper wurde die Membran anschließend dreimal für je zehn Minuten in TBS-T gewaschen. Zum immunochemischen Nachweis wurde anschließend ein speziesspezifischer Sekundärantikörper mit der assoziierten Meerrettich-Peroxidase (HRP) in 5%-iger Milch in TBS-T-Lösung zur Membran gegeben und diese wiederum für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend erfolgte erneut ein Waschvorgang, bei dem die Membran viermal für jeweils zehn Minuten in TBS-T gewaschen wurde.

Die fertig präparierte Membran konnte dann mit dem SuperSignal™ West Dura Chemilumineszenz-Substrat von Thermo Scientific behandelt werden. Dieses enthält zwei Reagenzien, ein HRP-Substrat und eine Luminol-Lösung, die im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran gegeben wurden. Aufgrund der an den Sekundärantikörper assoziierten HRP kann mithilfe der Reagenzien ein messbares Chemolumineszenz-Signal erzeugt werden, das vom ChemiDoc™ Imaging System detektiert wurde. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper oder die Ponceau S-Färbung verwendet.

6.3.5 Herstellung von TBS-T für Western-Blot-Analysen

Mithilfe von 1,5 M NaCl und 0,5 M Tris-HCl wurde eine 20x TBS-Lösung mit einem pH-Wert von 7,6 hergestellt. Diese wurde anschließend autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Zur Anwendung wurde die 20x TBS-Lösung mit Milli-Q-Wasser 20-fach verdünnt und pro Liter mit 1 mL Tween 20 versetzt. Der entstandene TBS-T 0,1 Puffer wurde mit einem Magnetrührer so lange gerührt, bis eine homogene Lösung entstanden ist.

6.4 Durchflusszytometrische Analysen (FACS)

Mithilfe der Durchflusszytometrie können Zellen anhand ihrer physikalischen Eigenschaften hinsichtlich Größe, Granularität und potenzieller Emission von Fluoreszenz untersucht werden. Dazu werden die Zellen in einer Glaskapillare einzeln an hochempfindlichen Lasern mit verschiedenen Wellenlängen vorbeigeschleust. Ebenso können die Zellen vorab mit geeigneten Reagenzien versetzt werden, um bestimmte Oberflächenproteine oder Apoptose-assoziierte Phospholipide wie Phosphatidylserin nachzuweisen und zu quantifizieren. Es ist außerdem möglich, bereits abgestorbene Zellen mit Propidium-Iodid anzufärben, da dieses die perforierte Zellmembran überwinden und als Nukleinsäure-Interkalator mit der DNA interagieren kann.

6.4.1 Standardverfahren und PI-Färbung

Zur Untersuchung von Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie wurden diese in der Regel in *6-well-plates* oder größeren Kulturschalen ausgesät und mit unterschiedlichen Medikamenten über einen definierten Zeitraum hinweg behandelt. Zum Zeitpunkt der Analyse wurden die Zellen geerntet, wobei das zuvor enthaltene Kulturmedium, die Waschlösung PBS und die Trypsin-Kulturmedium-Suspension nach dem Ablösen der Zellen gemeinsam gesammelt wurden. So wurde verhindert, dass bereits abgestorbene und somit nicht mehr adhärenente Zellen beim Ernten verloren gehen und die Analyse dadurch möglicherweise verfälscht wird. Die gesamte Zellsuspension wurde anschließend bei 300 xg und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand danach abgesaugt. Das verbliebene Zellpellet wurde in 0,5 mL PBS resuspendiert, um die Zellen von Trypsin und Kulturmedium-Resten zu reinigen, und erneut zentrifugiert. Nach dem erneuten Absaugen des Überstands wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen PBS resuspendiert und standen bereit für weitere Färbungen oder zur direkten durchflusszytometrischen Analyse mittels BD Accuri™ C6 Flow Cytometer. Zur standardmäßigen Untersuchung wurden die gemessenen Ereignisse zunächst in einem Dot Plot-Diagramm anhand der Parameter FSC (*Forward scatter* = Vorwärtsstreulicht) gegen SSC (*Side scatter* = Seitwärtsstreulicht) aufgetragen und daraus die lebenden, einzelnen Zellen ausgewählt. Somit konnten beispielsweise bei den HCT116-Zellen mithilfe des FITC-Kanals verifiziert werden, ob diese ein GFP-positives Signal emittieren. Für die weitergehende Quantifizierung der spät-apoptotischen und toten Zellen wurde zu der Probe 1 µL der Propidium-Iodid-Lösung hinzugegeben und sofort nochmal gemessen. Propidium-Iodid kann die defekte Zellmembran überwinden und lagert sich als Interkalator zwischen die komplementär gepaarten Basen ein. Es wird durch einen Laser mit der Wellenlänge 488 nm

angeregt und zeigt sein Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 610 bis 620 nm. Dabei wurden 10.000 der zuvor ausgewählten einzelnen, vermeintlich lebenden Zellen mithilfe des FL2-Kanals untersucht.

6.4.2 Annexin-V Apoptose Assay

Zum Vergleich der Apoptoserate verschiedener Genotypen unter dem Einfluss zytotoxischer Medikamente wurde Annexin-V als verwendet. Dieses bindet an das Phospholipid Phosphatidylserin, dass bei apoptotischen Zellen vermehrt auf der äußeren Seite der Zellmembran vorliegt. Dafür wurden in der Regel jeweils 3×10^5 Zellen in *6-well-plates* ausplattiert und 24 Stunden später mit $0,25 \mu\text{g/mL}$ Doxorubicin behandelt. Nach der Behandlungsdauer von weiteren 24 Stunden wurden die Zellen wie zuvor beschrieben geerntet. Nach einem Waschvorgang mit PBS wurden die Zellen erneut bei $300 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für fünf Minuten zentrifugiert und der entstandene Überstand abgesaugt. Das verbliebene Zellpellet wurde in $50 \mu\text{L}$ 1x Annexin-V Binding Buffer, welcher bereits mit $2,5 \mu\text{L}$ Annexin-V APC vermischt worden war, resuspendiert und für 15 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Bei diesem Schritt wurde ein Teil einer Probe lediglich in $50 \mu\text{L}$ des Binding Buffers ohne Annexin-V APC resuspendiert, um eine ungefärbte Kontrolle für die optimalen Einstellungen am FACS-Gerät zur Verfügung zu haben. Nach der Inkubationszeit wurden zu jeder Probe $400 \mu\text{L}$ des Binding Buffers hinzugegeben und innerhalb einer Stunde mit dem BD Accuri™ C6 Flow Cytometer im FL4-Kanal (Detektion des APC-Signals) gemessen. Abschließend wurde zu jeder Probe nach der Messung $1 \mu\text{L}$ einer Propidium-Iodid-Lösung (2 mg/mL) gegeben und unmittelbar erneut gemessen. Somit wurde der Anteil der apoptotischen, APC-positiven Zellen an der Gesamtpopulation bestimmt.

6.5 Tierexperimentelle Methoden

6.5.1 Allgemeine Haltungsbedingungen

Alle Mäuse wurden gemäß den Vorgaben des hessischen Tierschutzgesetzes bzw. der Tierschutz-Versuchstierverordnung gehalten und alle Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Gießen genehmigt. Mit Beginn der Experimente wurden die Tiere bis zur Tötung durch zervikale Dislokation unter SPF-Bedingungen (*specific pathogen free*) gehalten. Die Käfige wurden durch zertifizierte Tierpfleger wöchentlich gewechselt. Die Temperatur in der Tierhaltung betrug zwischen 20 °C und 22 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 50%. Die Tiere wurden entsprechend der Scoresheets (siehe Anhang, Abb. 37-40), die im Rahmen des jeweiligen Tierversuchsantrags erarbeitet wurden, ein- bis zweitäglich auf potenzielle Abbruchkriterien überprüft. Bei Erreichen des Versuchsendes oder Erfüllen der Abbruchkriterien wurden die Tiere sofort mittels zervikaler Dislokation getötet.

6.5.2 Sektion der Versuchstiere

Nach der Tötung der Mäuse durch zervikale Dislokation wurden sie fotografiert und gewogen. Im Rahmen der Sektion wurden sichtbare Tumore exzidiert, ebenfalls gewogen und in 4%-iger PFA-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Bauchdecke und das Peritoneum eröffnet und die Organe auf pathologische Veränderungen untersucht. Zuletzt wurden standardmäßig die Leber, Milz und die Lunge entnommen. Für die Entnahme der Lunge wurde zuvor die Trachea frei präpariert, mit einer Kanüle penetriert und eine 4%-ige Formalin-Lösung injiziert, damit sich die Lunge entfaltet hat und die Erythrozyten aus den Lungengefäßen ausgewaschen wurden. Somit konnte das Lungengewebe bei der anschließenden histologischen Analyse besser beurteilt werden.

6.5.3 Chemische Kanzerogenese in p53^{SA}-Mäusen

Dieser Versuch wurde unter der Ordnungsnummer G17/2018 vom Regierungspräsidium Gießen am 14. Mai 2018 genehmigt.

Für die Untersuchung der chemischen Kanzerogenese sollten durch subkutane Injektion des Kanzerogens 3-Methylcholanthren Fibrosarkome induziert werden (García-Cao et al., 2002; Wakita et al., 2009). Dafür erhielten zunächst drei p53^{SA}-Mäuse und drei p53^{WT}-Mäuse jeweils in beide Flanken eine s.c.-Injektion mit 100 µL Sesamöl mit 10 mg/mL 3-MC. Nach der Verifizierung der Methodik in der Pilotgruppe durch die Beobachtung von Tumorwachstum bei

den betroffenen Mäusen wurden weiteren 14 p53^{SA}-Mäusen und 13 p53^{WT}-Mäusen 3-MC gleichermaßen injiziert. Die Tiere wurden entsprechend des Scoresheets (siehe Anhang, Abb. 37 & 40) zweimal wöchentlich hinsichtlich des Tumorwachstums kontrolliert und dieses wurde mithilfe eines Schiebers gemessen. Sobald die Tumoren eine Größe von 5 mm erreicht haben, wurde die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. In der anschließenden Sektion wurde der Tumor beziehungsweise die Tumoren exzidiert und gewogen. Anschließend wurde eine Hälfte in 4%-iger Formalin-Lösung fixiert, während die andere Hälfte in ein frisches Reaktionsröhrchen gegeben und in flüssigem N₂ schockgefroren wurde.

6.5.4 CRISPR-induzierte Aktivierung des *Eml4-Alk*-Onkogens in p53^{SA}-Mäusen

Dieser Versuch wurde unter der Ordnungsnummer G37/2017 vom Regierungspräsidium Gießen am 3. Juli 2017 genehmigt.

Zur Untersuchung der Tumorigenese und des Tumorprogresses von *Eml4-Alk*-positiven Lungentumoren wurde eine intratracheale Infektion mit rekombinanten, replikationsdefizienten Adenoviren durchgeführt. Das somit in die Lungenepithelzellen eingeschleuste CRISPR/Cas9-Konstrukt bestand aus transienten Expressionskassetten für Cas9, zwei sgRNAs für die Gene *Eml4* (*echinoderm microtubule-associated protein-like 4*) und *Alk* (*anaplastic lymphoma kinase*) (Maddalo et al., 2014) sowie der Cre-Recombinase. Durch die beiden sgRNAs wurde die Cas9-Nuklease so programmiert, dass es zu Doppelstrangbrüchen in den entsprechenden Genen und einer anschließenden, fehlerhaften Reparatur gekommen ist. In der Folge entstand unter anderem durch eine Inversion das Fusionsonkogen *Eml4-Alk* (527 bp), dessen Genprodukt die Zellproliferation beschleunigt und maligne, nicht-kleinzellige Lungentumoren (NSCLCs) induziert. Ebenso kann es durch die Aktivität der beiden sgRNAs auch zu einer Inversion mit dem Ergebnis des *Alk-Eml4*-Fusionsgens (1.036 bp) sowie zu einer Deletion kommen. Für diesen Versuch wurden 22 p53^{WT}-Mäuse und 23 p53^{SA}-Mäuse verwendet, wobei zwei p53^{SA}-Mäuse aufgrund von Komplikationen direkt zu Beginn aus dem Versuch ausgeschieden sind.

Um sowohl die Tumorigenese als auch den Tumorprogress im Sinne des 3R-Prinzips (*Replacement, Reduction, Refinement*) so schonend wie möglich für die Tiere zu gestalten, wurden p53^{SA}- und p53^{WT}-Mäuse verwendet, die zuvor mit Luciferase-transgenen Mäusen (ROSA26^{LSL-GLuc} oder ROSA26^{LSL-FLuc}) gekreuzt wurden. In diesen Mäusen befindet sich vor dem *GLuc*- bzw. *FLuc*-Gen eine LSL-Kassette (*lox-stop-lox*), die aus zwei LoxP-Regionen und einem dazwischen liegenden Stop-Codon besteht. Ohne Cre-Recombinase wird das entsprechende Gen also nicht exprimiert, während eine aktive Cre-Recombinase die LSL-

Kassette entfernen kann und somit die Expression des dahinterliegenden Gens ermöglicht. Das Genom des verwendeten Adenovirus enthielt daher auch das Cre-Recombinase-Gen, um in den erfolgreich infizierten Lungenepithelzellen eine kontinuierliche Gaussia- und Firefly-Luciferase-Expression zu induzieren. Die Gaussia-Luciferase wird von den exprimierenden Zellen ins Blut sezerniert, sodass die Lumineszenzintensität mittels Luminometer nach Zugabe des Gaussia-Substrats (Coelenterazin) messbar ist. Die Firefly-Luciferase wird in den infizierten Zellen angereichert, sodass dessen Lumineszenz nach i.p.-Injektion von Luciferin mithilfe des In-Vivo Xtreme Imaging System von Bruker ebenfalls messbar ist. Während die Messung von Luciferasen im Blut ideal zur Quantifizierung der Tumorlast geeignet ist, ermöglicht das FLuc-Bioimaging darüber hinaus auch eine genaue Lokalisation des Tumors. Um zusätzlich einen Vergleich dieser für CRISPR-induzierte Tumormodelle neueren Imaging-Methoden zu den herkömmlichen Methoden zu ermöglichen, wurden im Verlauf bei sieben p53^{SA}- und sechs p53^{WT}-Mäusen ebenfalls zwei Kleintier-MRTs 4,5 und 6,5 Monate nach der Infektion durchgeführt. Die Versuchstiere wurden während des gesamten Versuchs kontinuierlich entsprechend der Scoresheets (siehe Anhang, Abb. 38-40) kontrolliert.

6.5.4.1 Narkose und intratracheale Infektion

Die für diesen Versuch verwendeten Tiere waren zwischen acht und 24 Wochen alt. Die Versuchstiere wurden mit 75 µL einer Adenovirus-Stammlösung infiziert. Diese bestand aus $1 \times 10^{10} - 5 \times 10^{10}$ PFU in DMEM mit 10 mM CaCl₂. Die Effizienz des Ad-Eml4-Alk-Cas9-Virus (ohne Cre-Recombinase) wurde zunächst *in-vitro* mit Lungenepithelzellen nach einer Infektionsdauer von 72 Stunden mittels PCR und Gelelektrophorese untersucht, indem die zu erwartenden, chromosomalen Rearrangements mit spezifischen Primern nachgewiesen wurden. Die notwendige Virusmenge für die *in-vivo* Infektion wurde zuvor von der Arbeitsgruppe in einer Pilotgruppe mit neun Mäusen und drei verschiedenen Virusmengen bestimmt. Die praktische Durchführung erfolgte weitestgehend analog zum publizierten Protokoll von *DuPage et al.* (siehe Abb. 10) (DuPage et al., 2009). Die vollständig antagonisierbare Narkose wurde unter tierärztlicher Aufsicht mit 500 µg/kg KG Medetomidin, 5 mg/kg KG Midazolam und 50 µg/kg KG Fentanyl (jeweils i.p.-Injektion) durchgeführt. Dabei wurde das maximale Injektionsvolumen von 10 mL/kg KG nicht überschritten. Die Narkose trat nach etwa zehn Minuten ein und hielt ohne Antagonisierung für etwa eine Stunde an. Den Tieren wurden anschließend $7,5 \times 10^8$ PFUs pro Maus intratracheal installiert. Die Antagonisierung wurde nach Ermessen der Tierärztin mit den folgenden Medikamenten durchgeführt: 750 µg/kg KG Atipamezol, 0,5 mg/kg KG Flumazenil und 1,2 mg/kg KG Naloxon (jeweils s.c.-Injektion).

Nach der Infektion erhielten die Tiere eine zweiwöchige Ruhephase, um sich von der Narkose und der Infektion angemessen zu erholen, bevor die ein- bis zweiwöchentlichen Blutentnahmen begonnen haben.

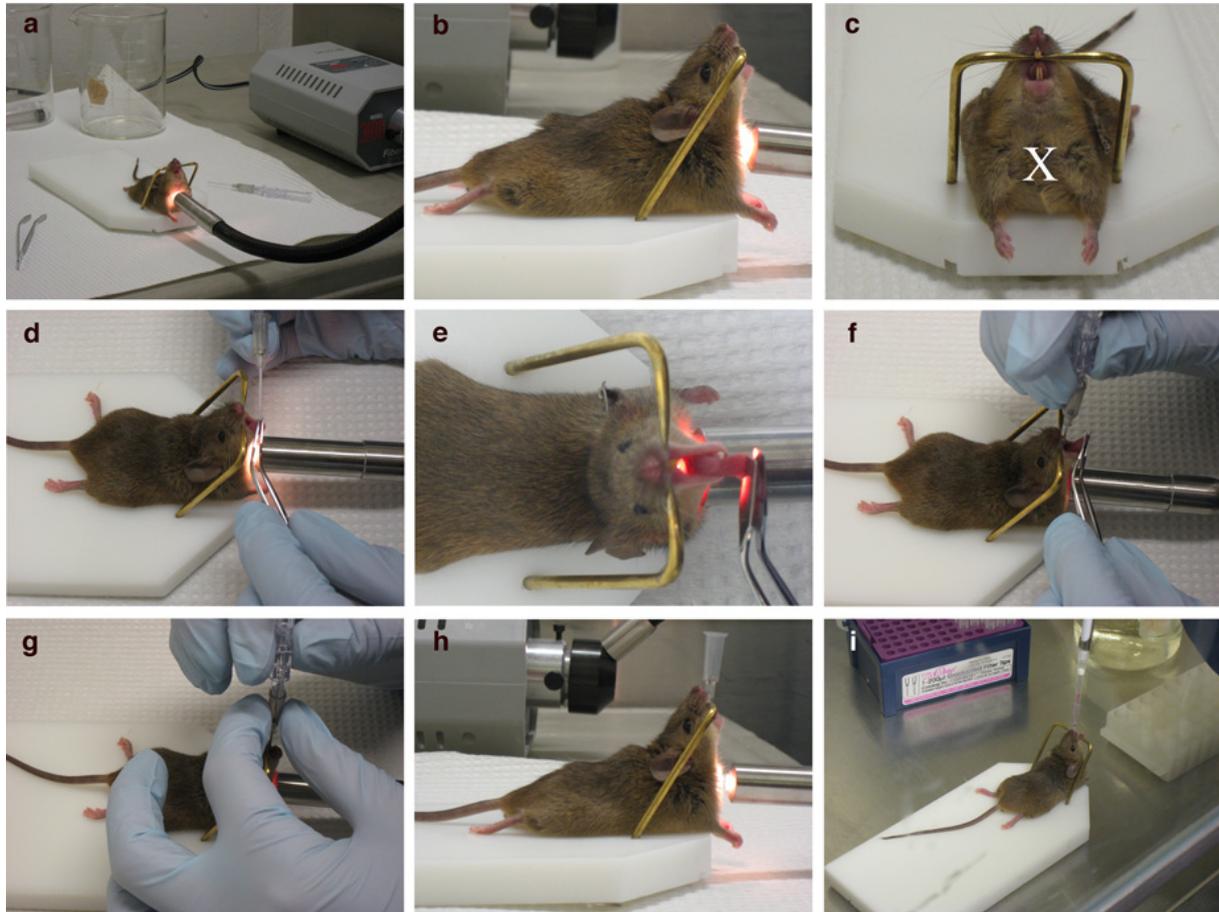


Abbildung 10: Durchführung der intratrachealen Infektion.

Die Versuchstiere wurden zunächst unter tierärztlicher Aufsicht gemäß den aufgeführten Methoden anästhesiert. Anschließend wurden die Mäuse wie in Bild (c) positioniert, sodass der Mund geöffnet war. Danach wurde die Zunge mit einer feinen Pinzette gegriffen und leicht herausgezogen (e), um die Kanüle korrekt intratracheal zu platzieren (f). Durch die Lichtquelle konnte die erfolgreiche Intubation verifiziert werden, da die Kanüle nur bei ordnungsgemäßer Lage in der Trachea sichtbar war. Nach der Intubation wurde die entsprechende Menge an Virussuspension in die Kanüle pipettiert (i) und abgewartet, bis die Versuchstiere das gesamte Volumen inhaliert hatten. Abschließend erfolgte die Extubation sowie die Antagonisierung der Narkose. Abbildung von *DuPage et al. (2009)*.

6.5.4.2 Blutentnahme aus der Schwanzvene

Zur Quantifizierung der Gaussia-Luciferase im Blut wurde 16 p53^{WT}-Mäusen und 14 p53^{SA}-Mäusen ein- bis zweiwöchentlich 20 µL Blut aus der Schwanzvene entnommen. Dafür wurden die Tiere zunächst unter SPF-Bedingungen in einem Restraint fixiert. Durch leichte

Kompression an der Schwanzwurzel erfolgt eine Hyperämisierung des Schwanzes, sodass anschließend eine der drei Schwanzvenen mit einer 20 G-Kanüle punktiert wurde. Das austretende Blut wurde in einem sterilen Blutentnahmeröhrchen mit 4 µL Heparin aufgefangen, für 15 Minuten bei 5.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das abgetrennte Plasma schließlich in ein frisches Blutentnahmeröhrchen mit ebenfalls 4 µL Heparin überführt. Die Plasmaproben wurden bis zur Messung bei -20 °C gelagert.

6.5.4.3 Messung der Gaussia-Luciferase-Aktivität im Blut

Im Verlauf wurden zu bestimmten Zeitpunkten die Plasmaproben mehrerer Entnahmetage gemessen. Dafür wurden jeweils 2,5 µL Plasma mit dem gleichen Volumen PBS verdünnt und in eine weiße 96-well-plate pipettiert. Die Luciferase-Aktivität wurde anschließend im Luminometer nach Zugabe von 100 µL Coelenterazin (1:200 in PBS verdünnt) gemessen. Als positive Kontrolle wurde Plasma einer CAG-GLuc Maus verwendet, deren Körperzellen kontinuierlich Gaussia-Luciferase exprimieren und sezernieren. Als negative Kontrolle diente das Plasma einer LSL-GLuc Maus, deren Expression des *GLuc*-Gens durch die LSL-Kassette unterbunden wurde.

6.5.4.4 Messung der Firefly-Luciferase-Aktivität im Biolumineszenz-Imaging (BLI)

Die Firefly-Luciferase wird nicht ins Blut ausgeschüttet und akkumuliert daher bei einer erfolgreichen Infektion ausschließlich innerhalb der Tumorzellen. Somit besteht neben der quantitativen Beurteilung von Tumorigenese und -progression mittels der Gaussia-Luciferase-Messung die Möglichkeit zur genauen Lokalisation des tumorösen Prozesses. Da nur zwei Bioimaging-Messungen pro Tier genehmigt wurden, fand die erste Untersuchung bei einem initialen Anstieg der Gaussia-Luciferase über 5.000 RLU (*relative light units*) im Blut statt. Die zweite Messung erfolgte anschließend etwa einen Monat später. Zur Messung der Firefly-Luciferase wurden etwa zehn Minuten vor der Einleitung der Narkose 10 µL/g KG des Firefly-Substrats D-Luciferin i.p. injiziert. Innerhalb der nächsten Minuten konnte sich das Substrat gleichmäßig im Körper verteilen. Anschließend wurden die Versuchstiere in eine spezielle Narkosebox mit einer Isoflurankonzentration von 3% gesetzt. Nach dem Eintreten der Narkose wurden die Tiere in den In-Vivo Xtreme II Imager von Bruker transferiert und auf eine 37 °C warme Bodenplatte gelegt. Im Gerät wurde die Narkose weiterhin durch eine Isoflurankonzentration von 1-2% aufrechterhalten. Die Expositionszeit betrug je nach

Signalstärke zwischen einer Sekunde und einer Minute. Die erstellten Bilder wurden anschließend mit Living Image® 4.0 ausgewertet.

6.5.4.5 Durchführung des μ MRTs für Kleintiere

Die Narkose, die für diese Untersuchung notwendig war, wurde wie unter Abschnitt 6.5.4.4 beschrieben durchgeführt. Sobald die Tiere narkotisiert waren, wurden sie im μ MRT Clinscan 70/30 USR von Bruker plaziert. Im Gerät wurde die Narkose weiterhin durch eine Isoflurankonzentration von 1-2% aufrechterhalten. Die erstellten Bilder wurden anschließend mit der Syngo MR B15 Software von Siemens ausgewertet.

6.5.4.6 Lyse von murinem Lungengewebe

Zum Nachweis des gewünschten chromosomalen Rearrangements in den Lungenepithelzellen der infizierten Versuchstiere wurde die zuvor mittels Sektion extrahierte Lunge in beide Lungenflügel aufgeteilt. Ein Lungenflügel diente der histologischen Analyse, während der anderen Lungenflügel lysiert wurde, um anschließend gDNA zu isolieren. Dafür wurde der Lungenflügel zunächst mit einem Skalpell mechanisch zerkleinert und anschließend mit dem peqGOLD Tissue DNA Mini Kit nach Herstellerangaben lysiert. Danach konnte die gDNA gemäß Abschnitt 6.2.5 isoliert werden und das Fusionsonkogen mittels PCR amplifiziert und durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt werden.

6.6 Histologische Methoden

Die entnommenen Organe und Tumoren wurden für mindestens 24 Stunden in 4%-iger PFA-Lösung fixiert, anschließend entwässert und in Paraffinblöcken eingebettet. Zum Entwässern wurden folgende Schritte durchgeführt:

Isopropanol I	zwei Stunden
Isopropanol II	zwei Stunden
Paraffin I	zwölf Stunden (oder über Nacht)
Paraffin II	acht Stunden
Paraplast	zwölf Stunden (oder über Nacht)

Nach dem Einbetten in Paraffinblöcke wurden aus den Präparaten mit einem Mikrotom einzelne Schnitte angefertigt und auf Objektträger übertragen. Vor der Anfärbung mussten die Gewebeschnitte zunächst entparaffiniert und rehydriert werden. Dafür wurde folgende Schritte durchgeführt:

Rotihistol I	zehn Minuten
Rotihistol II	zehn Minuten
100% Ethanol	fünf Minuten
96% Ethanol	drei Minuten
80% Ethanol	drei Minuten
70% Ethanol	drei Minuten
dest.H ₂ O	zwei Minuten

Die Schnitte wurden gefärbt und anschließend mit dem Aperio Versa 8 Scanner von Leica eingescannt und mit dem Aperio eSlide Manager am PC analysiert.

6.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.-E.-Färbung) wurde 1867 von *Schwarz* erstmals publiziert und macht sich die chemischen Eigenschaften der einzelnen Zellkompartimente und der extrazellulären Matrix (EZM) zu nutze. Dabei färbt Hämatoxylin die basophilen, also sauren, Zellbestandteile, zu denen vor allem der Zellkern mit der negativ geladenen DNA als auch das raue Endoplasmatische Retikulum (ER) gehören. Eosin hingegen färbt die eosinophilen bzw.

acidophilen, also basischen, Zellbestandteile, zu denen Proteine, Mitochondrien und das glatte ER gehört. Innerhalb der EZM werden Kollagenfasern durch Eosin angefärbt.

Zur Färbung von fixierten Gewebeschnitten wurden diese nach der Rehydrierung aus dem destillierten Wasser direkt für eine Minute in Mayers Hämalaunlösung gegeben. Anschließend fand ein Waschvorgang unter fließendem Leitungswasser für zehn Minuten statt. Danach erfolgte die Gegenfärbung mit 0,1% Eosin für zehn Sekunden, bevor die Schnitte anhand der folgenden Schritte wieder dehydriert wurden:

dest.H ₂ O	2x eintauchen
80% Ethanol	2x eintauchen
96% Ethanol	2x eintauchen
Isopropanol	fünf Minuten
Xylol I	fünf Minuten
Xylol II	fünf Minuten

Abschließend wurden die Gewebeschnitte auf den Objektträgern mit Entellan® sowie einem Deckgläschen bedeckt und waren bereit für die Beurteilung unter dem Mikroskop.

6.6.2 Immunhistochemische Färbungen

Mithilfe von immunhistochemischen Färbungen können gezielt Proteine auf einem Gewebeschnitt mittels spezifischer Antikörper und gekoppelten Enzymreaktionen visualisiert werden.

Zur Färbung der Gewebeschnitte mussten diese zunächst wie unter Abschnitt 6.6 beschrieben entparaffiniert und rehydriert werden. Danach wurden die Schnitte für 20 Minuten bei 100 °C in einen vorgeheizten Dampfgarer gegeben und für 20 Minuten in Tris-EDTA-Puffer (pH 9,0) gekocht. Bei der Anfärbung von p-ERK wurden die Schnitte in Citrat (pH 6,0) gekocht. Diese beiden Vorgänge führen zur Demaskierung der Antigene, indem Fixations-bedingte Quervernetzungen aufgelöst werden (Shi et al., 1991). Anschließend wurden die Proben für 20 Minuten in destilliertem Wasser abgekühlt und zweimal mit TBS-T sowie einmal mit TBS für jeweils fünf Minuten gewaschen. Um die endogene Peroxidase-Aktivität zu blockieren, folgte eine zehnminütige Inkubation in 3% H₂O₂ in dest.H₂O und eine erneute Waschung mit TBS-T und TBS wie zuvor beschrieben. Im nächsten Schritt wurden die entsprechenden Erstantikörper (siehe Abschnitt 5.4.1) in *Dako REAL Antibody Diluent* verdünnt, auf den Gewebeschnitt gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte

ein weiterer Waschvorgang mit TBS-T und TBS wie zuvor beschrieben und anschließend die Inkubation mit dem Biotin-gekoppelten Zweitantikörper (siehe Abschnitt 5.4.2) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Erzeugung eines sichtbaren Signals wurden die Gewebeschnitte erneut mit TBS-T und TBS gewaschen, für 30 Minuten mit der Streptavidinperoxidase bei Raumtemperatur inkubiert und danach erneut gewaschen. Schließlich erfolgte eine Gegenfärbung mit dem DBA-Substrat-Kit von Pierce™ nach Herstellerangaben, bevor die Gewebeschnitte auf den Objektträgern mit Entellan® sowie einem Deckgläschen bedeckt wurden und bereit für die Beurteilung unter dem Mikroskop waren.

6.6.3 Auswertung der histologischen Proben

Die Auswertung der H.-E.-Färbung sowie der immunhistochemischen Färbungen erfolgte nach dem Einscannen der gefärbten Gewebeschnitte mit dem Aperio eSlide Manager von Leica. Die Quantifizierung der immunhistochemischen Färbungen wurde mit dem *Positive Pixel Count Algorithm v9* durchgeführt. Dafür wurden verschiedene Farbintensitäten festgelegt, die einer positiven IHC-Färbung entsprechend. Anschließend konnten die Bilder mittels ImageScope automatisiert analysiert ist.

6.7 Statistische Methoden

Die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen wurde mit GraphPad Prism 9 durchgeführt. Die Auswertung der q-RT-PCR-Daten mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode erfolgte mit Microsoft Excel 2007. Die statistischen Analysen zur Ermittlung der p-Werte, die bei einem Wert von $p < 0,05$ als signifikant galten, wurden mit GraphPad Prism 9 durchgeführt. Ebenso sind alle selbst erstellten graphischen Auswertungen mittels GraphPad Prism 9 und Microsoft PowerPoint 2021 angefertigt worden.

7 Ergebnisse

7.1 Charakterisierung der CRISPR-modifizierten HCT116 p53-Phospho-Mutanten

7.1.1 Nachweis der korrekt eingebrachten Mutation in Codon 183 und 185

Zu Beginn wurden die hemizygoten p53^{-/AA}-, p53^{-/DD}- und p53^{-/+}-HCT116-Einzelzellklone, die bereits von der Arbeitsgruppe erstellt worden waren, charakterisiert. Bei diesen Zellen wurde ein Allel mittels einer CRISPR/Cas9-vermittelten Deletion inaktiviert. Im zweiten Allel wurde durch eine Transfektion ein Vektor mit einem inaktivierten Puromycin-Resistenz-Gen und einem GFP-Gen in das Intron 4 eingebracht, die von zwei LoxP-Regionen flankiert wurden. Mithilfe einer zweiten Transfektion wurde anschließend der oben genannte Vektor durch einen neuen Vektor ausgetauscht. Dieser enthielt ein intaktes Puromycin-Resistenz-Gen zur nachfolgenden Selektion zusammen mit einem GFP-Gen und der gewünschten Mutation im Exon 5, positioniert auf dem entsprechenden homologen Arm. Eine abschließende Überexpression der Cre-Recombinase durch eine adenovirale Infektion führte zur Exzision der LSL-Kassette, sodass GFP-negative, hemizygoten p53-Zelllinien entstanden sind. Dabei stellen die p53^{-/AA}-Zellen die *phospho-deficient* p53-Mutante her, dessen Serin in Position 183 und 185 zu Alanin umgewandelt wurde (TCA>GCC; AGC>GCC). Bei den p53^{-/DD}-Zellen wurde das Serin in Position 183 und 185 zu Asparaginsäure umgewandelt (TCA>GAC; AGC>GAC), sodass eine *phospho-mimic* p53-Mutante gebildet wurde (siehe Abb. 11). Die hemizygoten p53^{-/+}-exprimierenden Zellen wurden sowohl hier als auch in den nachfolgenden Experimenten als Kontrolle verwendet, da die p53-Phospho-Mutanten (p53^{-/AA}, p53^{-/DD}) ebenfalls von hemizygoten Zelllinien synthetisiert wurden.

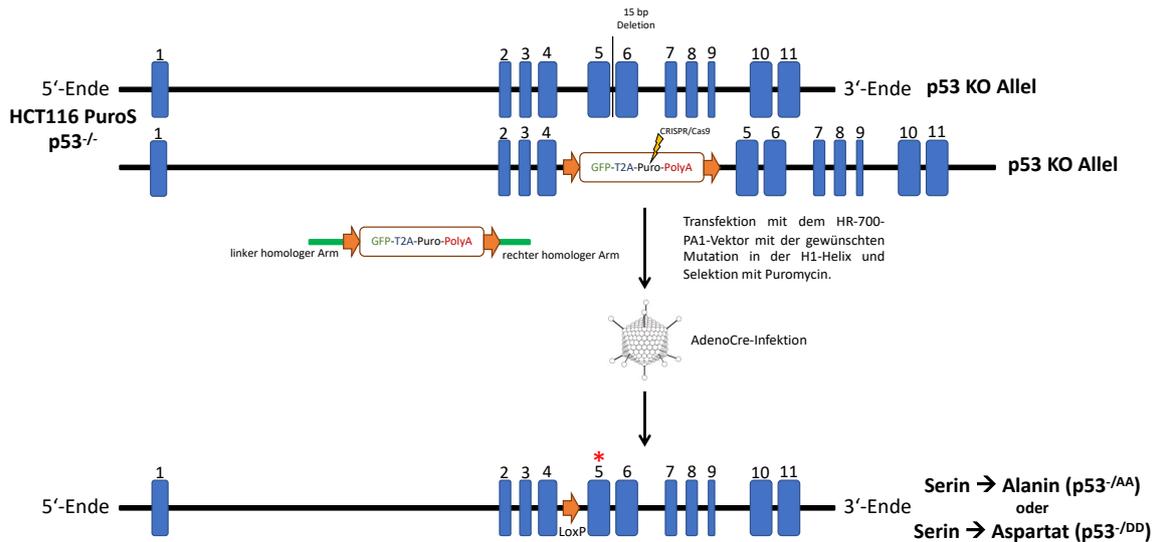


Abbildung 11: Generierung der HCT116 Spock-Zelllinie.

Dargestellt sind die beiden Allele der HCT116 PuroS p53^{-/-}-Zelllinie. Durch die Transfektion mit dem HR-700-PA1-Vektor, der die gewünschte Mutation der Serin-Moleküle im rechten homologen Arm enthält, und einer anschließenden AdenoCre-Infektion entsteht die hemizygoten Spock-Zelllinie. Der rote Stern markiert die Stelle der gewünschten Mutation (Serin zu Alanin, bzw. Serin zu Aspartat) in Exon 5 im endogenen *TP53*-Genlokus. Modifiziert nach Maria Klimovich.

Zur Bestätigung, dass die gewünschte Phospho-Mutation korrekt in das Genom eingebracht wurde, und zum Ausschluss von Mismatch-Mutationen bei der Transfektion mit dem HR-700-PA1-Vektor (zweiter Vektor) oder neu aufgetretenen Punktmutationen, wurde die *TP53*-cDNA der HCT116-Zelllinien sequenziert. Dabei wurden Primer verwendet, die für die Sequenz kodieren, in der die Phospho-Mutation lokalisiert ist. Die Sequenzierung durch *LGC Genomics* zeigte, dass in allen getesteten Klonen die korrekte Mutation vorlag (siehe Abb. 12).

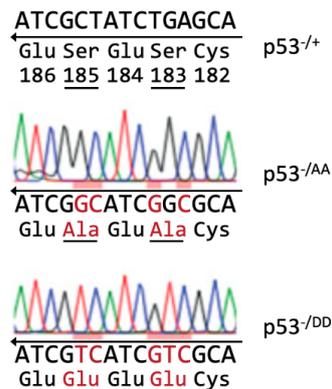


Abbildung 12: cDNA-Sequenzierung der p53-Phospho-Mutanten.

Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse. Die Codons 183 und 185 der *phospho-deficient* p53-Mutante der p53^{-/AA}-Zelllinie codierten nicht mehr für Serin, sondern für Alanin (TCA>GCC; TAG>GCC). Bei der getesteten *phospho-mimic* p53-Mutante der p53^{-/DD}-Zelllinie codierten die Codons 183 und 185 für Asparaginsäure statt Serin (TCA>GAC; AGC>GAC).

7.1.2 Analyse der p53-Expression in Einzelzellklonen

Als nächstes wurde untersucht, ob eine p53-Proteinexpression in den p53^{-AA}- und p53^{-DD}-Zelllinien induzierbar ist und ob sich das Proteinlevel auf einem vergleichbaren Niveau zum p53-Konstrukt der hemizygoten p53^{-/+}-Kontrollzellen befindet. Weiterhin sollte die p53-vermittelte p21-Induktion getestet werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen ausplattiert und über 48 Stunden mit 100 nM des Mdm2-Inhibitors RG7388 behandelt. Dabei erfolgte im Vorfeld eine Auswahl von Klonen, die mikroskopisch ein normales Wachstum in der Zellkultur gezeigt haben.

Im anschließend durchgeführten Western-Blot zeigte sich eine induzierbare p53-Antwort auf die Behandlung mit RG7388 in allen untersuchten Zelllinien (siehe Abb. 13). Dabei war zwar das Basisniveau der p53-Proteinmenge bei den getesteten Klonen vergleichbar, während jedoch das Proteinlevel nach Induktion mit RG3788 zwischen den p53^{-AA}- und p53^{-DD}-Zelllinien variierte (siehe Banden -/AA #22 und -/DD #5, #12 und #20). Weiterhin hob sich das p53-Proteinlevel bei den hemizygoten p53^{-/+}-Kontrollzellen sowohl vor als auch nach der Induktion deutlich davon ab. Während das p53-Proteinlevel in den homozygoten WT-Zellen dieses noch übertraf, war überraschenderweise sogar ein p53-Basisniveau und eine ausgeprägte Induktion durch RG7388 bei der homozygoten K.O.-Kontrolle (p53^{-/-}) sichtbar. Diese Beobachtung konnte in nachfolgenden Experimenten nicht erneut beobachtet werden, sodass möglicherweise eine Verunreinigung vorlag. Bezüglich der p53-vermittelten p21-Induktion zeigten sich bei den p53-Phospho-Mutanten deutliche Unterschiede, die einerseits das Basis-Proteinlevel der nicht-induzierten Proben betrafen, aber auch nach der Induktion zu sehen waren (siehe -/DD #5 und -/DD #12). So war bei diesen beiden Zelllinien keine Veränderung im p21-Proteinlevel durch die Behandlung mit RG7388 sichtbar. Bei den p53-Konstrukten der Zelllinien p53^{-AA} #22 und p53^{-DD} #20 konnte jedoch eine mäßige Steigerung der p21-Expression durch die p53-Induktion gezeigt werden. Im Vergleich dazu war bei den Kontroll-Zelllinien (WT, p53^{-/-} und p53^{-/+}) die jeweils zu erwartende p21-Induktion eingetreten, bzw. ausgeblieben, wobei das Proteinlevel auch hier bei den p53-positiven Kontrollen (WT und p53^{-/+}-Zelllinie) deutlich über dem der p53-Phospho-Mutanten lag. Hierzu sei jedoch anzumerken, dass die Poncaeu S-Färbung zur Lade-Kontrolle der übertragenen Protein-Menge starke Unterschiede aufwies und dadurch zumindest für einen Teil der Unterschiede verantwortlich war (vergleiche Proteinmenge der Banden von -/DD #5 und -/DD #20).

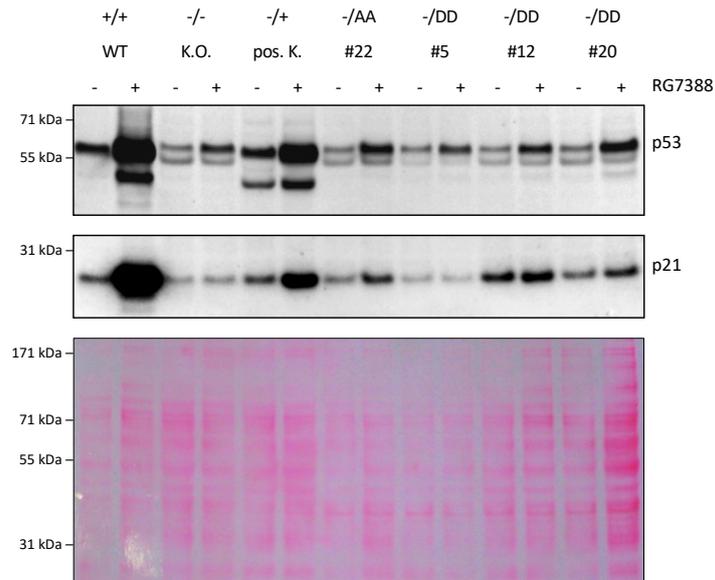


Abbildung 13: Western-Blot mit p53- und p21-Proteinleveln nach Induktion durch RG7388.

Im Western-Blot werden die p53-Konstrukte von Wildtyp- (WT), Knock-Out- (K.O.) und der hemizygoten, positiven Kontroll-Zelllinie (pos. K.) zusammen mit den p53-Phospho-Mutanten (p53^{-AA} #22; p53^{-DD} #5, #12, #20) ohne (-) und mit (+) 48-stündiger Behandlung mit dem Mdm2-Inhibitor RG7388 (100 nM) dargestellt. Untersucht wurden die Proteinlevel von p53 sowie das Produkt von dessen Zielgen (p21). Die darunter dargestellte Ponceau S-Färbung desselben Blots dient als Kontrolle der auf die Membran übertragenen Proteinmenge.

Wie eingangs beschrieben, wird *TP53* zwar kontinuierlich exprimiert, aber dessen Produkt p53 auch ebenso kontinuierlich Mdm2-vermittelt degradiert, sofern keine p53-stabilisierenden Stresssignale auf die Zelle einwirken. Daher sollte anschließend überprüft werden, wie es zu der ausgeprägten Differenz in dem Proteinexpressionsniveau sowohl von p53 als auch von dem konsekutiv induziertem p21 gekommen ist. Zu diesem Zweck wurde eine q-RT-PCR durchgeführt, um das p53-Genexpressionsniveau auf dem mRNA-Level der p53^{-AA}-, p53^{-DD}- und der p53^{WT}-Zelllinien zu vergleichen. Dafür wurden zehn verschiedene p53^{-AA}-Klone und zwölf verschiedene p53^{-DD}-Klone untersucht. Auch hier zeigte sich eine signifikant verringerte *TP53*-Transkription in allen p53-Phospho-Mutanten (siehe Abb. 14). Das mRNA-Level der HCT116-Wildtyp-Zellen war etwa 5- bis 10-fach erhöht, wodurch die beobachteten Unterschiede der p53- und p21-Proteinlevel (siehe Abb. 13) erklärt werden konnten.

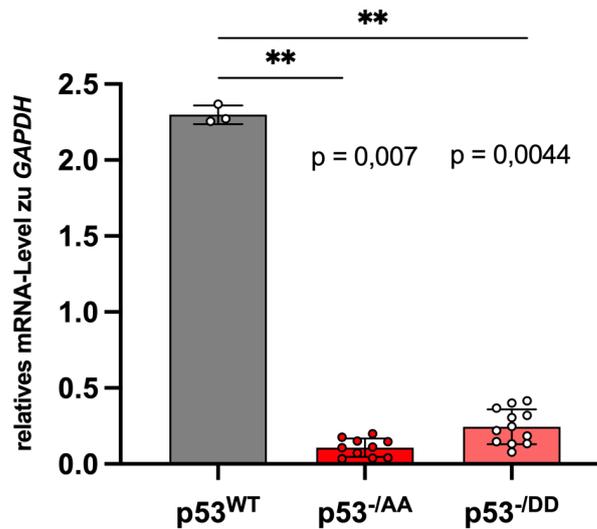


Abbildung 14: q-RT-PCR mit TP53-Expressionsniveau.

Mittels q-RT-PCR wurde das relative *TP53*-mRNA-Level in Bezug zum *housekeeping gene GAPDH* bestimmt. Jeder Punkt entspricht einem Wert der drei untersuchten p53^{WT}-Zelllinien bzw. der zehn p53^{-/-AA}- und der zwölf p53^{-/-DD}-Klone. Es zeigt sich eine 5- bis 10-fach erhöhte Genexpression von *TP53* in den p53^{WT}-Zellen verglichen mit p53^{-/-AA} ($p = 0,007$) und mit p53^{-/-DD} ($p = 0,0044$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Für die statistischen Analysen wurden jeweils Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

Daraus ergab sich die Fragestellung, ob dafür ein *Loss of Heterozygosity* von *TP53* oder möglicherweise eine inkomplette Exzision der LSL-Kassette in der untersuchten Zellpopulation ursächlich ist. Diese würde in einer veränderten Bandengröße des *TP53*-cDNA-Konstrukts resultieren. Somit wurden die cDNA-Proben der vorherigen q-RT-PCR (siehe Abb. 14) verwendet und mittels Gelelektrophorese aufgetragen, um das geringere Expressionsniveau wiederholt zu bestätigen und um vor allem die korrekte Bandengröße der *TP53*-cDNA der Phospho-Mutanten zu untersuchen (siehe Abb. 15).

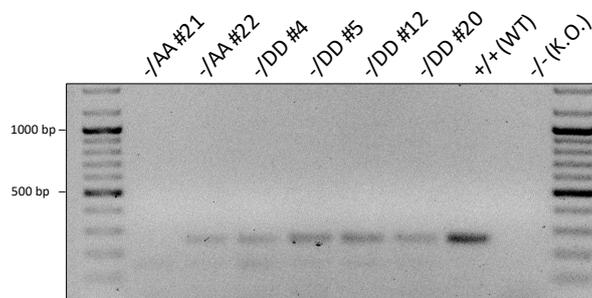


Abbildung 15: Gelelektrophorese der p53-cDNA.

Die in der q-RT-PCR verwendeten PCR-Produkte (siehe Abb. 14) wurde mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die *TP53*-cDNA-Konstrukte der Phospho-Mutanten (p53^{-/-AA} #22, p53^{-/-DD} #4, #5, #12, #20) wiesen die gleiche Bandengröße wie das *TP53*-cDNA-Konstrukt der WT-Zellen auf. Bei dem Klon p53^{-/-AA} #21 und der negativen Kontroll-Zelllinie (K.O.) war das *TP53*-cDNA-Niveau unterhalb des Detektionslevels.

Auch hier bestätigte sich, wie erwartet, das geringere p53-Expressionsniveau der Phospho-Mutanten. Die verwendete cDNA aller getesteten Phospho-Mutanten wies jedoch keine erkennbaren Unterschiede in der Bandengröße auf. Demnach war die Länge der zugrundeliegenden mRNA vergleichbar und das verringerte p53-Expressionsniveau vermutlich nicht auf eine inkomplette Exzision der LSL-Kassette zurückzuführen.

7.1.3 Die Phospho-Mutanten sind polyklonal und exprimieren GFP

Durch die Infektion der CRISPR-modifizierten HCT116-Zellen mit dem AdCre-Virus sollte die LSL-Kassette entfernt werden, damit *TP53* mit der eingebrachten Mutation exprimiert werden kann. Bei diesem Vorgang wird das GFP-Gen, welches zwischen den beiden LoxP-Regionen lokalisiert ist, entfernt. Bei nicht-rekombinanten Zellen sowie bei den verwendeten K.O.-Zellen ($p53^{-/-}$) liegt weiterhin eine GFP-Expression sowie eine ausbleibende p53-Expression vor.

Daher wurden die verwendeten Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop beurteilt und mittels Durchflusszytometrie auf eine mögliche GFP-Expression untersucht. Hier ließ sich ein starkes GFP-Signal bei über 95% der Zellen im FITC-Kanal feststellen, welches für eine ausgeprägte Synthese von GFP in diesen Zellen spricht (siehe Abb. 16).

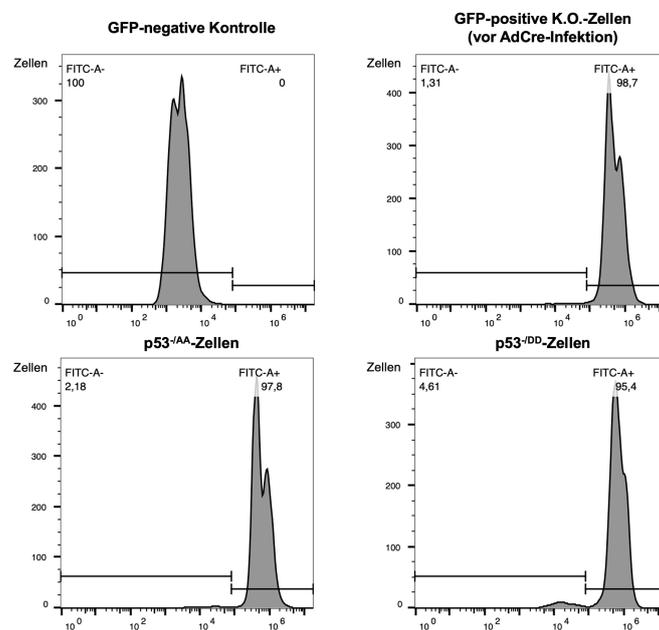


Abbildung 16: Durchflusszytometrie der Phospho-Mutanten zur Analyse des GFP-Signals.

Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Untersuchung. Bei der Analyse der Phospho-Mutanten ($p53^{-/AA}$ - und $p53^{-/DD}$ -Zellen) zeigten sich über 95% der Zellen als GFP-positiv. Zur Detektion des GFP-Signals wurde der FITC-Kanal verwendet. Nach erfolgter Rekombination durch die AdCre-Infektion hätte die LSL-Kassette samt GFP-Gen entfernt werden müssen.

Die überwiegend GFP-positiven Zellen zeigten, dass es sich bei den verwendeten Zellen nicht um monoklonale, rekombinante Einzelzellklone, sondern um polyklonale, hauptsächlich nicht-rekombinante Zellen handelte. Das erklärt die nicht nachweisbare bis schwache p53-Expression, da bei den meisten Zellen die LSL-Kassette in Intron 4 von *TP53*, die die Expression von p53 unterdrückt, weiterhin vorlag. Aus diesem Grund mussten die Zellen erneut mit AdCre infiziert und GFP-negative Einzelklone ausgewählt werden, um monoklonale Zellkolonien der beiden Phospho-Mutanten zu generieren.

7.1.4 Nach erneuter AdCre-Infektion liegt eine äquimolare p53-Expression vor

Nach der Erkenntnis, dass die verwendeten Zellkolonien polyklonal sind, wurde eine erneute Infektion mit AdCre durchgeführt, um mittels Cre-Recombinase die LSL-Kassette zu entfernen. Zum Nachweis der erfolgreichen Rekombination wurde anschließend die Fluoreszenz-Emission der Zellen via Durchflusszytometrie im FITC-Kanal gemessen und mit nicht-infizierten Zellen verglichen (siehe Abb. 17). Dabei zeigt sich eine Verschiebung des GFP-Signals bei den Phospho-Mutanten vor der adenoviralen Infektion mit 2,18% ($p53^{-/AA}$) und 4,61% ($p53^{-/DD}$) GFP-negativen Zellen zu 54,5% ($p53^{-/AA}$) und 54,6% ($p53^{-/DD}$) GFP-negativen Zellen nach der Infektion mit AdCre.

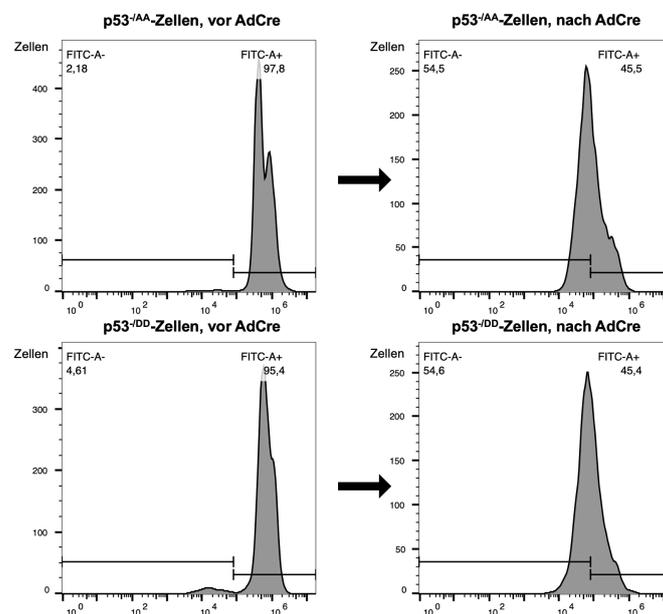


Abbildung 17: Durchflusszytometrie der Phospho-Mutanten zur Analyse des GFP-Signals nach AdCre-Infektion.

FACS-Analyse der infizierten Phospho-Mutanten ($p53^{-/AA}$ - und $p53^{-/DD}$ -Zellen) fünf Tage nach der Infektion mit AdCre. Zur Detektion des GFP-Signals wurde der FITC-Kanal verwendet. In der Durchflusszytometrie wurden die infizierten mit den gleichen nicht-infizierten Zellen verglichen. Es wird deutlich, dass das GFP-Signal in den infizierten Zellen abgenommen hat, sodass ein Großteil der Zellen erfolgreich infiziert und rekombiniert wurden.

Nach der Infektion wurden GFP-negative Einzelzellklone ausgewählt und amplifiziert. Diese Zellen sollten anschließend auf eine durch Zellstress induzierbare und äquimolare p53-Expression hin untersucht werden, um nachfolgend weitere Experimente durchzuführen. Dafür wurden die Zellen über 24 Stunden mit 10 μ M des Mdm2-Inhibitors Nutlin behandelt und anschließend das p53-Proteinlevel mittels Western-Blot (siehe Abb. 18) und Immunfluoreszenz-Färbung (IF) (siehe Abb. 19) analysiert.

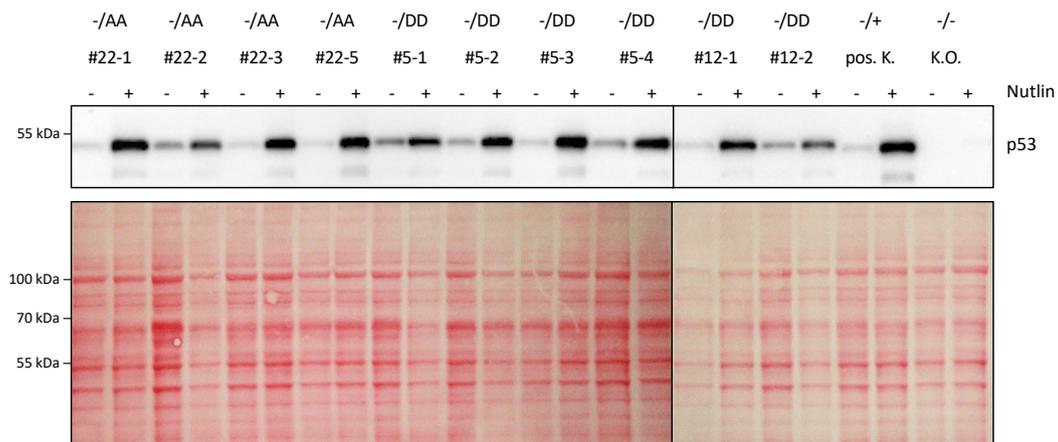


Abbildung 18: Western-Blot der neuen Einzelklone mit p53-Proteinleveln nach Induktion durch Nutlin.

Im Western-Blot werden die p53-Konstrukte von Knock-Out-Zellen (K.O.) und der hemizygoten, positiven Kontroll-Zelllinie (pos. K.) zusammen mit den ausgewählten Einzelklonen der erneut infizierten p53-Phospho-Mutanten (p53^{-/AA} #22-1, #22-2, #22-3, #22-5; p53^{-/DD} #5-1, #5-2, #5-3, #5-4, #12-1, #12-2) ohne (-) und mit (+) 24-stündiger Behandlung mit dem Mdm2-Inhibitor Nutlin (10 μ M) dargestellt. Untersucht wurde das Proteinlevel von p53. Die darunter dargestellte Ponceau S-Färbung desselben Blots dient als Kontrolle der auf die Membran übertragenen Proteinmenge.

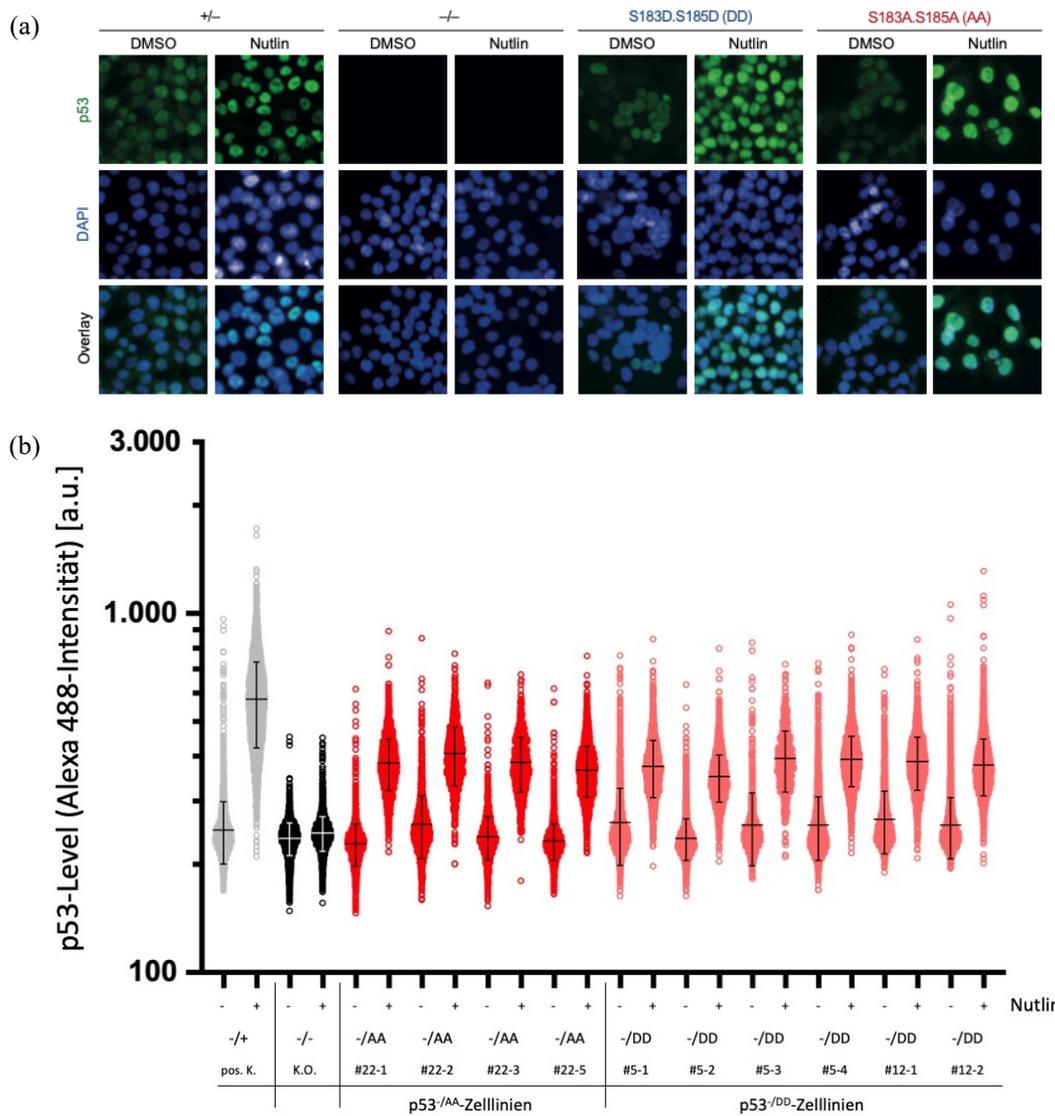


Abbildung 19: Immunfluoreszenz der neuen Einzelzellklone mit p53-Lokalisation und Quantifizierung des p53-Levels nach Induktion durch Nutlin.

Im dargestellten Experiment wurden Knock-Out-Zellen (K.O.) und die hemizyote, positive Kontroll-Zelllinie (pos. K.) zusammen mit den ausgewählten Einzelklonen der erneut infizierten p53-Phospho-Mutanten (p53^{-/AA} #22-1, #22-2, #22-3, #22-5; p53^{-/DD} #5-1, #5-2, #5-3, #5-4, #12-1, #12-2) ohne (-) und mit (+) 24-stündiger Behandlung mit dem Mdm2-Inhibitor Nutlin (10 μ M) untersucht. **(a)** Es wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt, die mittels *high-content Bioimaging* ausgewertet wurde. Dafür wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI verwendet, der an Adenin-Thymin-reiche DNA-Regionen bindet und somit intranukleär lokalisierte DNA anfärbt. p53 wurde durch den primären Antikörper DO-1 gebunden und durch den sekundären Antikörper Alexa Fluor 488 für die Fluoreszenz-Messung detektierbar. Im Overlay bestätigt sich somit die intranukleäre Lokalisation von p53 sowie dessen Akkumulation durch Nutlin-vermittelte Induktion. Repräsentative Darstellung jeder Zelllinie ausgewählt. **(b)** Weiterhin erfolgte eine Quantifizierung des Alexa Fluor 488-Signals (a.u. = *arbitrary unit*). Jeder Punkt entspricht dem Fluoreszenzsignal einer Zelle der entsprechenden Zelllinie bzw. des entsprechenden Klons. Es zeigt sich eine basale Hintergrundaktivität sowie eine vergleichbare Induktion von p53 durch Nutlin bei allen Klonen der Phospho-Mutanten verglichen mit den Wildtyp-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Die ausgewählten Einzelzellklone der AdCre-infizierten Zellen zeigten im Western-Blot eine zur hemizygoten, positiven Kontrolle (p53^{+/+}) vergleichbare basale p53-Proteinexpression. Weiterhin konnte durch eine Induktion mit Nutlin eine deutliche und unter den getesteten Zelllinien vergleichbare Steigerung in der p53-Proteinexpression nachgewiesen werden. Die negativen Kontrollzellen (p53^{-/-}) zeigten wie erwartet, unabhängig von der spezifischen Induktion, keine p53-Expression. Auch die Immunfluoreszenzfärbung bestätigte ein äquimolares p53-Proteinlevel in den verschiedenen Phospho-Mutanten verglichen mit den hemizygoten, positiven Kontrollzellen (p53^{+/+}) sowohl auf basalem Niveau als auch nach p53-Induktion. Darüber hinaus konnte zusätzlich mittels DAPI-Färbung im Overlay die intranukleäre Lokalisation von p53 und dessen Stabilisierung durch die Inhibition von Mdm2 bestätigt werden.

Nachdem die ausgeprägten Unterschiede in der p53-Proteinexpression zu Beginn der Versuche am ehesten auf eine fehlende Rekombination in den entsprechenden Zellen zurückzuführen waren, konnte eine erneute AdCre-Infektion und Auswahl von Einzelzellklonen das Problem beheben. Somit konnten anschließend verschiedene Stress-induzierte Reaktionen untersucht werden, um die beiden Phospho-Mutanten zu charakterisieren.

7.1.5 Die *phospho-mimic* Mutante ist Apoptose-resistent gegenüber genotoxischem Stress

Um die p53-abhängigen Zellschicksalsentscheidungen zu untersuchen, wurden die *phospho-mimic* und *phospho-deficient* exprimierenden Zelllinien (p53^{-/DD} & p53^{-/AA}) im Vergleich zu p53^{+/+}- und p53^{-/-}-Zelllinien in ihrer Reaktion auf genotoxischen Stress hin verglichen. Dafür wurden alle Zellen mit dem Anthrazyklin Doxorubicin behandelt. Durch die Interkalation von Doxorubicin in die DNA entsteht eine Blockade der Topoisomerase II, sodass vermehrt Doppelstrangbrüche entstehen, die zur Stabilisierung von p53 führen.

Um zunächst das Zellwachstum unter genotoxischer Therapie zu untersuchen, wurde eine *Live-Cell-Imaging*-Analyse durchgeführt, wobei eine Abnahme der Konfluenz einer Reduktion der Anzahl lebendiger Zellen entspricht (siehe Abb. 20). Dafür wurden jeweils drei Klone der beiden Phospho-Mutanten, p53^{+/+}- und p53^{-/-}-Zelllinien in Triplikaten in eine 96-well-plate ausgesät und 0,25 µg/mL Doxorubicin hinzugegeben. Im Verlauf von etwa fünf Tagen unter einer durchgehenden Behandlung mit Doxorubicin wurde die Konfluenz via Incucyte-Monitoring alle vier Stunden gemessen. Nach den ersten 48 Stunden waren keine Unterschiede zwischen den behandelten Genotypen sowie zwischen behandelten und nicht-behandelten Zellen detektierbar. Mit Beginn des dritten Tages nahm die Konfluenz der behandelten Zellen verglichen mit den nicht-behandelten Kontrollen bei allen Genotypen ab. Auffällig ist die starke

Abnahme der Konfluenz bei den p53^{-/AA}-Klonen. Die Abnahme der Konfluenz der p53^{-/AA}-Zellen übertrifft dabei nicht nur die der p53^{-/DD}-Zellen (p = 0,0001), sondern auch die der p53^{-/+}-Zellen mit hoher Signifikanz (p < 0,0001). Demnach scheint das *phospho-deficient* p53 in den p53^{-/AA}-Zellen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber gentoxischem Stress zu führen, während die p53^{-/DD}-Zellen deutlich resistenter in Bezug auf die induzierte Apoptose reagieren.

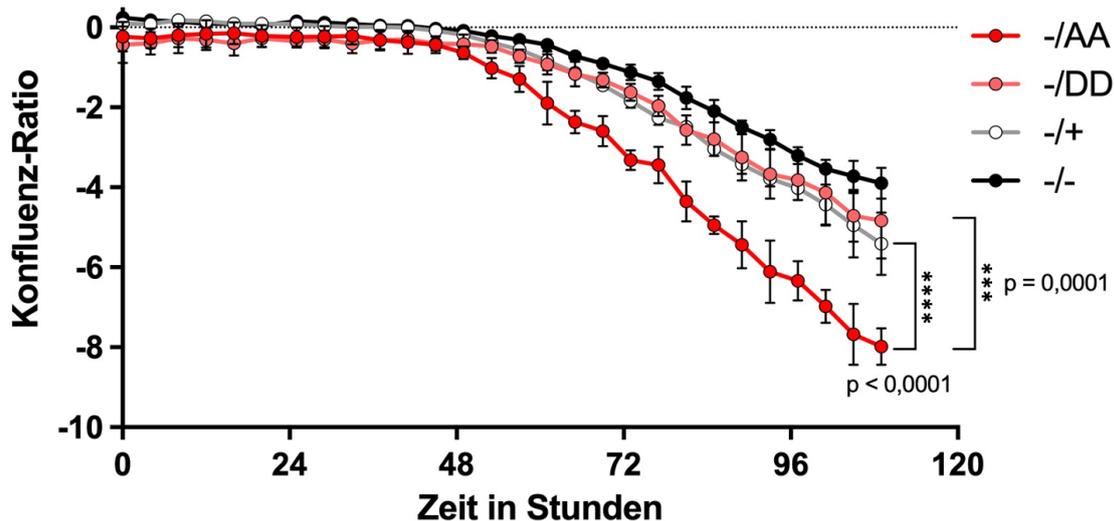


Abbildung 20: Live-Cell-Imaging-Analyse unter Doxorubicin-Behandlung.

Quantifizierung der Konfluenz von behandelten im Vergleich zu nicht-behandelten Zellen des gleichen Genotyps via Incucyte-Monitoring über einen Zeitraum von etwa fünf Tagen. Die Behandlung erfolgte mit 0,25 µg/mL des Apoptose-Induktors Doxorubicin. Die Konfluenz-Ratio wurde aus der durchschnittlichen Konfluenz der behandelten technischen und biologischen Replikate (DK_T) im Verhältnis zur durchschnittlichen Konfluenz der gleichen nicht-behandelten Zellen (DK_K) zum selben Zeitpunkt berechnet ($\frac{DK_T}{DK_K}$). Für die Phospho-Mutanten (p53^{-/AA} und p53^{-/DD}) wurden jeweils biologische Triplikate verwendet. Für die Kontrollzelllinien (p53^{-/+} und p53^{-/-}) wurden jeweils technische Triplikate verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels paarweisem t-Test für die Messungen von -/AA vs. -/DD (p = 0,0001) und -/AA vs. -/+ (p < 0,0001).

Um mögliche Ursachen der erhöhten Sensitivität der p53^{-/AA}-Zelllinie zu untersuchen, wurden weitere Experimente durchgeführt. Dafür wurden die gleichen Zellen wie zuvor ebenfalls für 24 Stunden mit 0,25 µg/mL Doxorubicin behandelt, mit Annexin-V gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe Abb. 21). Annexin-V bindet dabei an das Phospholipid Phosphatidylserin, welches bei apoptotischen Zellen vermehrt auf der Außenseite der Zellmembran vorliegt. Die unbehandelten Zellen zeigen als Ergebnis ein basales, untereinander vergleichbares Apoptose-Niveau, wohingegen die Behandlung mit Doxorubicin zu einer dreifach erhöhten Apoptoserate in den p53^{-/AA}-Klonen führt. In der p53^{-/+}-Zelllinie (hemizygot, positive Kontrolle) ist die Apoptoserate lediglich etwa doppelt so hoch, während

in den p53^{-DD}-Klonen nur eine leicht vermehrte Apoptose nachweisbar ist. Der Unterschied in der Apoptoserate zwischen den p53^{-AA}- und den p53^{-DD}-Zelllinien als auch zwischen der p53^{-AA}-Zelllinie und den p53^{-/+}-Zellen ist damit signifikant (p = 0,0022, bzw. p = 0,0238). Auffällig ist weiterhin, dass nach Doxorubicin-Behandlung kein signifikanter Unterschied in der Apoptoserate zwischen der p53^{-DD}-Zelllinie, die die *phospho-mimic* Mutante exprimiert, und der p53 K.O.-Zelllinie (p53^{-/-}) zu sehen ist (p = 0,9048).

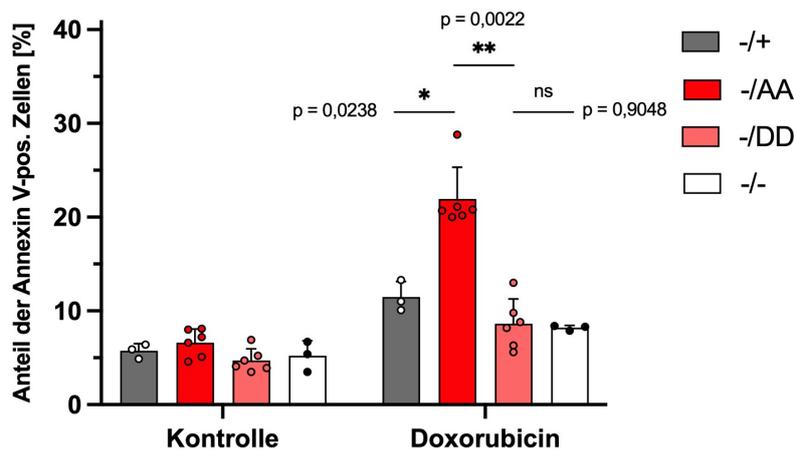


Abbildung 21: FACS-Analyse mit Annexin-V-Färbung nach Doxorubicin-Behandlung.

Bei der abgebildeten FACS-Analyse wurden die Zellen mit Annexin V gefärbt, um die Apoptoserate ohne und mit Behandlung mit dem Apoptose-Induktor Doxorubicin zu bestimmen. Die Behandlung erfolgte über 24 Stunden mit 0,25 µg/mL Doxorubicin. Es zeigt sich eine signifikant erhöhte Apoptoserate der p53^{-AA}-Klone verglichen mit den p53^{-DD}-Klonen (p = 0,0022) und mit den p53^{-/+}-Zellen (p = 0,0238). Zwischen den p53^{-DD}-Klonen und den p53^{-/-}-Zellen (K.O.-Zelllinie) gibt es keine Unterschiede nach Doxorubicin-Behandlung (ns = nicht signifikant; p = 0,9048). Es wurden jeweils die Zellen eines Klons für die positive Kontrolle (p53^{-/+}) und für die negative Kontrolle (p53^{-/-}) sowie jeweils die Zellen zweier Klone der Phospho-Mutanten (p53^{-AA} und p53^{-DD}) untersucht. Dabei wurden jeweils Triplikate verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Für die statistischen Analysen wurden jeweils Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

Für die weitergehende Analyse der zugrundeliegenden Mechanismen wurde nach identischer Behandlung der gleichen Zellen das Proteinlevel des vom p53-Zielgen *CDKN1A* synthetisierten Proteins p21 sowie des Apoptosemarkers cPARP (*cleaved poly (ADP-ribose)-polymerase*) im Western-Blot untersucht (siehe Abb. 22). Es zeigt sich wie zuvor eine gleichmäßige p53-Stabilisierung im Rahmen der Doxorubicin-Behandlung. Bei der hemizygoten Positiv-Kontrolle ist erwartungsgemäß eine leichte Erhöhung des p21-Proteinlevels sowie eine minimale Erhöhung des Proteinlevels von cPARP zu beobachten, die bei der Negativ-Kontrolle entsprechend ausbleiben. Gleichzeitig zeigen die verwendeten p53^{-AA}-Klone ein deutlich erhöhtes Proteinlevel von p21 sowie eine eindeutige Akkumulation des Apoptosemarkers cPARP. Diese Reaktion ist bei den *phospho-mimic* exprimierenden p53^{-DD}-Klonen auf einem vergleichbaren Niveau zu den p53^{-/+}-Zellen und damit nicht bzw. kaum nachweisbar.

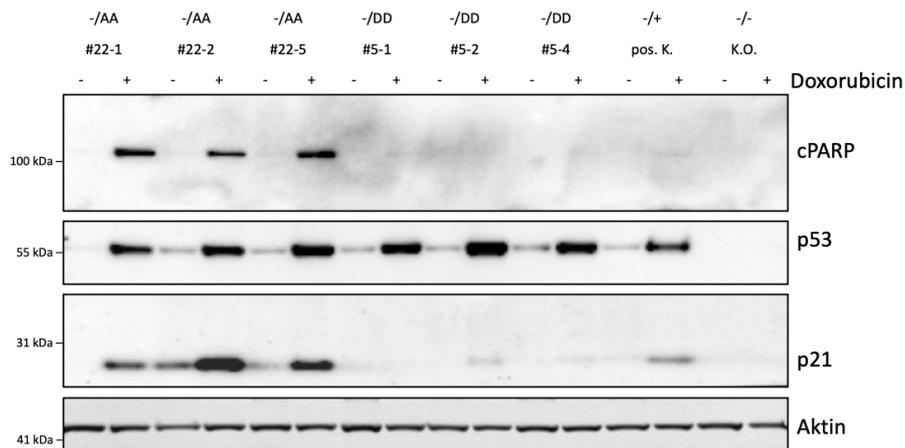


Abbildung 22: Western-Blot mit Nachweis Apoptose-spezifischer Proteine unter Doxorubicin-Behandlung.

Im Western-Blot werden die p53-Konstrukte von Knock-Out-Zellen (K.O.) und der hemizygoten, positiven Kontroll-Zelllinie (pos. K.) zusammen mit den ausgewählten Klonen der p53-Phospho-Mutanten (p53^{-/AA} #22-1, #22-2, #22-5; p53^{-/DD} #5-1, #5-2, #5-4) ohne (-) und mit (+) 24-stündiger Behandlung mit dem Apoptose-Induktor Doxorubicin (25 µg/mL) dargestellt. Untersucht wurden die Proteinlevel von p53 sowie das Produkt von dessen Zielgen (p21) und der Apoptosemarker cPARP. Die Aktin-Bande dient als Kontrolle der auf die Membran übertragenen Proteinmenge.

7.1.6 p53^{-/AA} führt zu einer deutlich stärkeren Induktion von p53-Zielgenen als p53^{-/DD}

Als Ursache der erhöhten Apoptoserate der p53^{-/AA}-Zelllinie kommt möglicherweise eine verstärkte transkriptionelle Aktivität insbesondere der pro-apoptotischen Zielgene in Betracht. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Expression der p53-Zielgene auf molekularbiologischer Ebene untersucht (siehe Abb. 23). Um vor allem die Unterschiede zwischen den Phospho-Mutanten zu analysieren, wurden zu diesem Zweck Zellen der entsprechenden Genotypen (p53^{-/AA} und p53^{-/DD} mit K.O.-Kontrolle p53^{-/-}) wie zuvor über 24 Stunden mit 0,25 µg/mL Doxorubicin behandelt und anschließend deren mRNA isoliert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mittels q-RT-PCR analysiert. Bei der Analyse wurde die Expression der verschiedenen p53-Zielgene *CDKN1A* (kodiert für p21), *MDM2*, *PUMA* und *NOXA* jeweils in Relation zur Expression des *housekeeping gene GAPDH* bestimmt.

Es zeigt sich in allen untersuchten Genen nach 24 Stunden eine sehr geringe Zunahme der Genexpression in den K.O.-Zellen, die demnach am ehesten auf p53-unabhängige Apoptose-Mechanismen zurückzuführen sind (siehe Abb. 23). Beim Vergleich der Phospho-Mutanten untereinander fällt eine deutlich stärkere Induktion der Zielgene in den p53^{-/AA}-Zellen in Relation zu den p53^{-/DD}-Zellen auf. Die Expression von *NOXA* in den p53^{-/AA}-Zellen ist nur minimal stärker als in den p53^{-/DD}-Zellen und damit nicht signifikant (p = 0,7). Bei den anderen

untersuchten Genen *CDKN1A*, *MDM2* und *PUMA* kann jedoch eine signifikante 5- bis 10-fache Steigerung beobachtet werden (p jeweils $< 0,0001$).

So zeigen die $p53^{-/DD}$ -Zellen unter genotoxischem Stress eine verminderte transkriptionelle Aktivität der untersuchten *p53*-Zielgene als die $p53^{-/AA}$ -Zellen. Das legt nahe, dass die erhöhte Apoptoserate der $p53^{-/AA}$ -Zellen aus den vorherigen Experimenten auf eine verstärkte Aktivierung der pro-apoptotischen Gene der *phospho-deficient* Mutante zurückzuführen ist. Außerdem spielen offensichtlich auch *p53*-unabhängige Apoptose-Mechanismen eine Rolle.

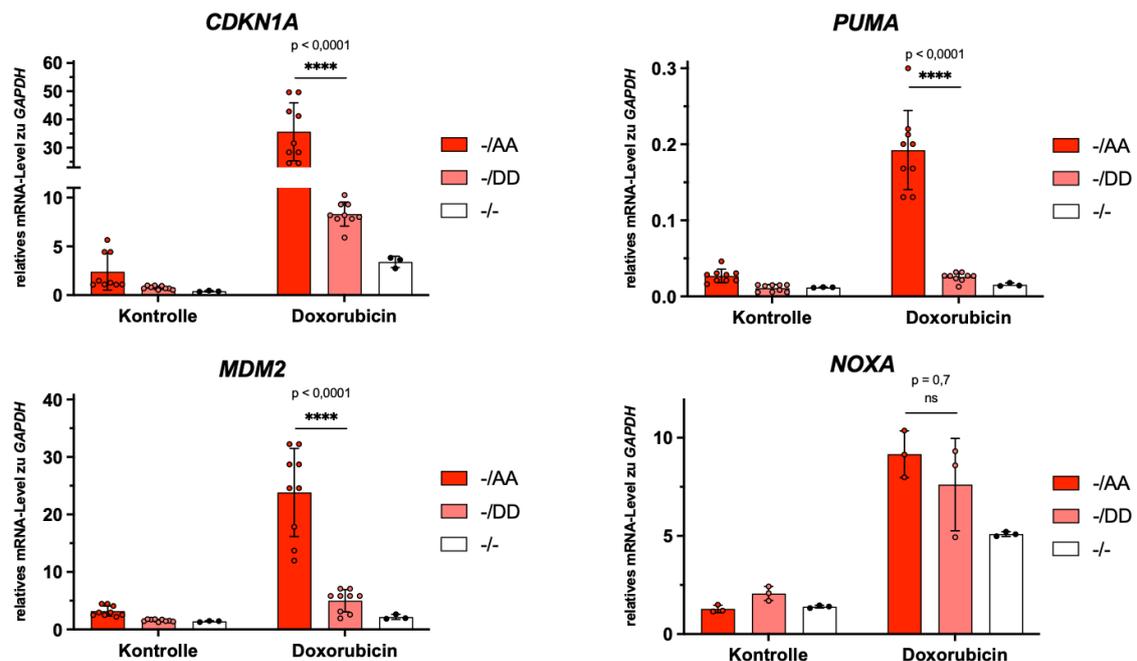


Abbildung 23: q-RT-PCR-Analyse von *p53*-Zielgenen unter Doxorubicin-Behandlung.

Für die q-RT-PCR-Analyse wurden Zellen der aufgeführten Genotypen über einen Zeitraum von 24 Stunden mit dem Apoptose-Induktor Doxorubicin behandelt. Für die Untersuchung der Gene *CDKN1A*, *MDM2* und *PUMA* wurden jeweils Triplikate von drei $p53^{-/AA}$ - und $p53^{-/DD}$ -Klonen sowie einer $p53^{-/-}$ -Zelllinie verwendet. Für die Untersuchung des Gens *NOXA* wurden von allen dargestellten Genotypen Triplikate jeweils einer Zelllinie verwendet. Bei den Genen *CDKN1A*, *MDM2* und *PUMA* zeigt sich eine hochsignifikant verstärkte Expression in der $p53^{-/AA}$ -Zelllinie im Vergleich zur $p53^{-/DD}$ -Zelllinie (p jeweils $< 0,0001$). Bezüglich *NOXA* lässt sich dies nicht beobachten ($p = 0,7$). Die relative Quantifizierung erfolgte mittels $\Delta\Delta Ct$ -Methode. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Für die statistischen Analysen wurden jeweils Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

7.2 Chemische Induktion von Karzinomen bei der p53^{SA}-Maus

In den nachfolgenden *in-vivo* Experimenten wurde untersucht, ob die fehlende Phosphorylierung des Serin-Moleküls nahe der H1-Helix in einer verstärkten p53-vermittelten Tumorsuppression resultiert. Dafür wurde als Versuchstier die sogenannte p53^{SA}-Maus verwendet. Diese wurde von der Arbeitsgruppe aus konditionalen B6.129S/Sv-Trp53^{tm3Thst} Knock-In Mäusen generiert, die eine Punktmutation im Codon 180 (TCC>GCC) des endogenen TP53-Allels aufwiesen. Dadurch wurde das ursprüngliche, phosphorylierbare Serin zu einem *phospho-deficient* Alanin umgewandelt. Neben der gewünschten Mutation enthielt das mittels *Gene Targeting* eingebrachte Konstrukt auch eine LSL-Kassette, die zunächst die Expression des mutierten TP53-Allels blockierte. Daher wurden die heterozygoten p53^{+/LSL-S180A} mit Prm-Cre transgenen Mäusen (129S/Sv-Tg(Prm-cre)58Og/J) gekreuzt. Die Cre-Recombinase stand in diesen Mäusen unter der Kontrolle des *Protamin 1*-Promotors, sodass es zur Exzision der LSL-Kassette in den männlichen Keimbahnzellen kam. Anschließend wurden diese Tiere mit weiblichen 129/Sv Wildtyp-Tieren gekreuzt, um heterozygote p53^{+/S180A}-Mäuse zu erzeugen. Diese Mäuse wurden schließlich untereinander gekreuzt, um homozygote p53^{S180A/S180A}-Mäuse (kurz p53^{SA}-Maus) und Wildtyp-Tiere (kurz p53^{WT}-Maus) als Kontrolle zu züchten.

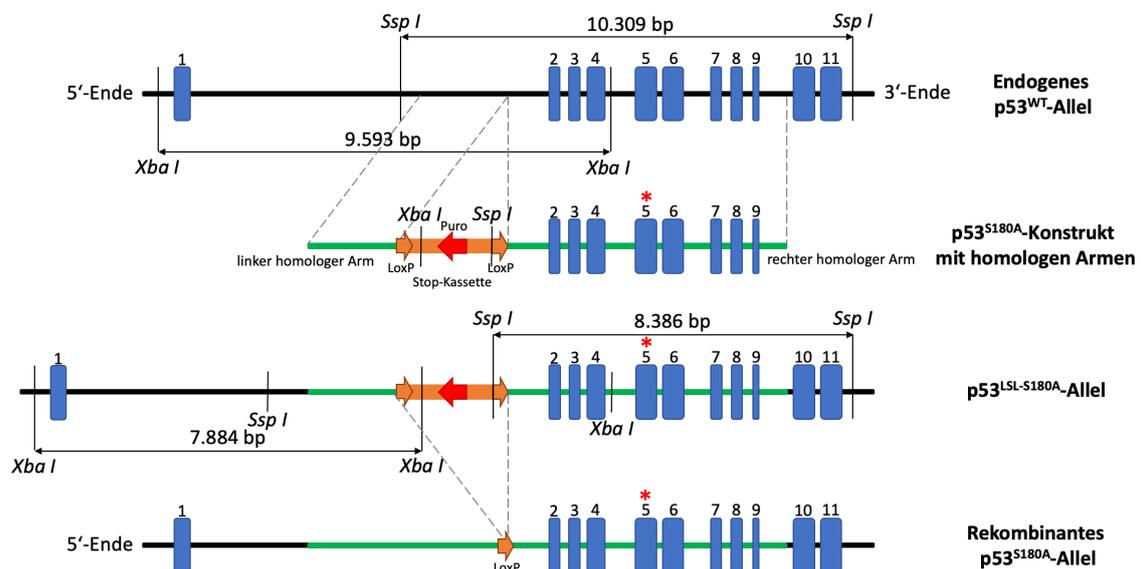


Abbildung 24: Gene Targeting zur Erzeugung eines endogenen, murinen TP53^{SA}-Allels.

Dargestellt ist das endogene, murine TP53^{WT}-Allel sowie das p53^{S180A}-Konstrukt, dass mittels Rekombination in den TP53-Genlokus eingebracht wird. Die erfolgreiche Rekombination kann durch einen Kontrollverdau bestätigt werden (Restriktionsstellen: *Xba I* und *Ssp I*). Nach der Rekombination wurde anschließend die LSL-Kassette mithilfe der Cre-Recombinase entfernt, sodass das rekombinante TP53^{S180A}-Allel im endogenen TP53-Genlokus entstand. Der rote Stern markiert die Stelle der gewünschten Mutation (Serin zu Alanin) in Exon 5. Modifiziert nach *Timofeev et al. (2013)*.

7.2.1 Induktion von Tumoren durch 3-Methylcholantren nach s.c.-Injektion

Um die Fragestellung der verstärkten p53-vermittelten Tumorsuppression bei der p53^{SA}-Maus zu untersuchen, wurde das Karzinogen 3-Methylcholantren (3-MC) p53^{WT}- und p53^{SA}-Mäusen subkutan injiziert, um chemisch induzierte Fibrosarkome zu erzeugen. Dafür hat zunächst eine Pilotgruppe mit jeweils drei Mäusen pro Genotyp das Karzinogen injiziert bekommen, um die Effizienz der chemischen Kanzerogenese zu verifizieren. Nach etwa zwölf Wochen war der erste Tumor bei einer p53^{WT}-Maus detektierbar (siehe Abb. 25) und nach einer weiteren Woche wurden bei den zwei verbliebenen p53^{WT}-Mäusen sowie bei einer p53^{SA}-Maus ebenfalls Tumoren entdeckt. Daraufhin wurden alle Tiere der Pilotgruppe getötet und auf weitere Tumoren untersucht. Alle gefundenen Tumoren wurden gewogen und ausgemessen. Mit einem detektierbaren Tumorwachstum bei drei von drei p53^{WT}-Mäusen und einer von drei p53^{SA}-Mäusen nach etwa dreizehn Wochen war die Effizienz der chemischen Kanzerogenese durch s.c.-Injektion von 3-MC nachgewiesen. Somit konnte anschließend der Versuchsgruppe das Karzinogen injiziert werden.



Abbildung 25: Tumor nach s.c.-Injektion von 3-MC.

Die abgebildete Maus zeigt einen ausgeprägten, einseitigen Tumorbefund in der rechten hinteren Flanke nach s.c.-Injektion von 1 mg des Karzinogens 3-Methylcholantren pro Flanke.

7.2.2 Analyse der Tumorigenese von p53^{WT}- und p53^{SA}-Mäusen bei 3-MC induzierter Kanzerogenese

Nach der Verifizierung der Kanzerogenese durch s.c.-Injektion von 3-MC wurde den Tieren der Hauptversuchsgruppe, bestehend aus 14 p53^{WT}- und 13 p53^{SA}-Mäusen, das Karzinogen injiziert. Die Versuchstiere wurden über die kommenden Monate zweimal wöchentlich mittels Palpation auf ein beginnendes Tumorwachstum kontrolliert. Ab dem Auftreten eines Tumors wurde dieser täglich gemessen, um das Abbruchkriterium (Tumorgröße > 5 mm) rechtzeitig festzustellen und die Tiere gemäß Tierversuchsantrag zu töten (für detaillierte Abbruchkriterien siehe Scoresheet zum Versuch; Anhang Abb. 37).

Die ersten Tumoren traten 79 Tage nach der Injektion auf, während manche Tiere knapp 300 Tage tumorfrei blieben. Sowohl im tumorfreien Überleben als auch im Überleben insgesamt

zeigen sich keine Unterschiede zwischen den p53^{WT}- und p53^{SA}-Mäusen (siehe Abb. 26a & b). Die mittlere tumorfreie Überlebenszeit ist mit 122 Tagen bei beiden Genotypen identisch ($p = 0,3294$). Ebenso gibt es beim mittleren Gesamtüberleben mit 154 Tagen bei den p53^{WT}-Tieren und 149 Tagen bei den p53^{SA}-Tieren keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,5484$). Nach Tötung der Versuchstiere mittels zervikaler Dislokation wurden die Tumoren exzidiert und deren Größe und Gewicht bestimmt. Auch bei diesen Parametern gibt es keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 26c). Das Durchschnittsgewicht der exzidierten Tumoren der p53^{WT}-Mäuse liegt bei 0,41 g, bei den p53^{SA}-Mäusen beträgt es 0,89 g ($p = 0,21$). Die Durchschnittsgröße der Tumoren ist beinahe identisch mit 1,17 cm im Durchmesser bei den p53^{WT}-Mäusen und 1,15 cm im Durchmesser bei den p53^{SA}-Mäusen ($p = 0,7386$). Somit konnten im Rahmen der durchgeführten Experimente und Analysen keine Unterschiede bei der chemisch induzierten Kanzerogenese zwischen der p53^{SA}- und der p53^{WT}-Maus festgestellt werden.

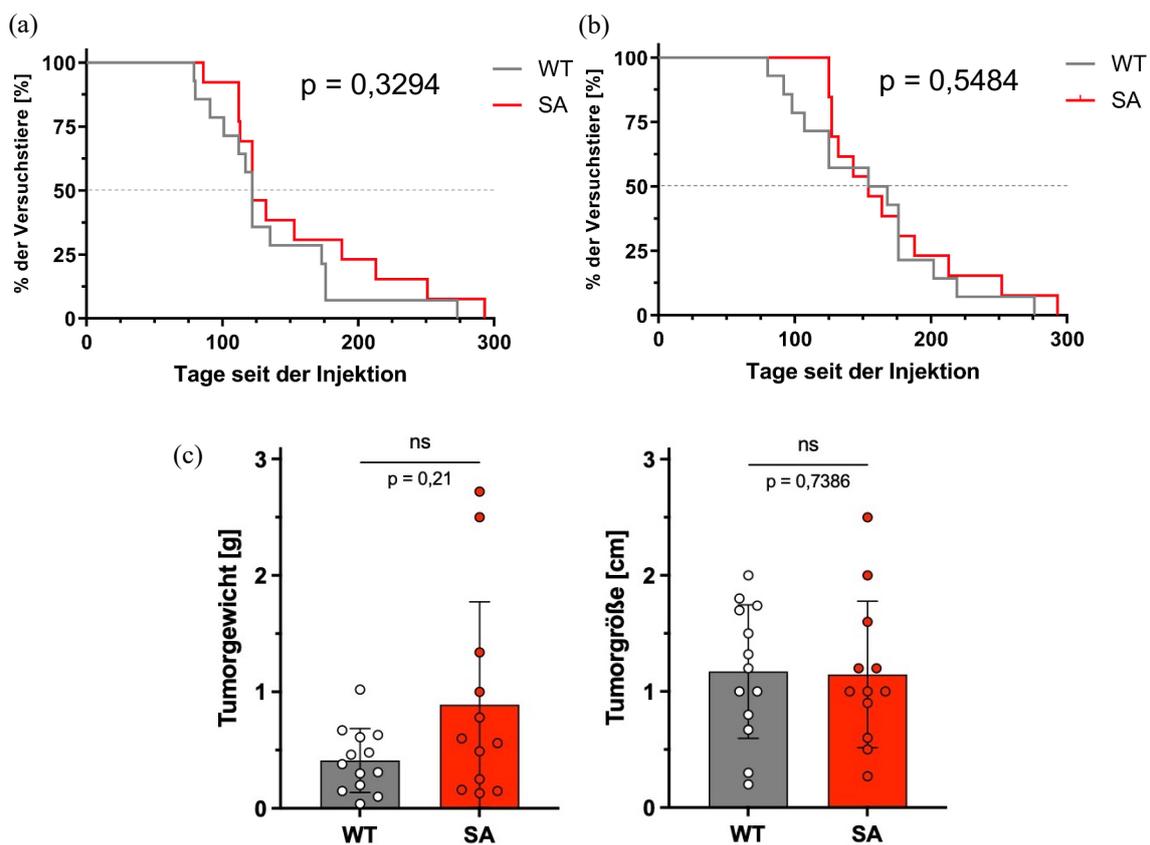


Abbildung 26: Überlebenskurven und Vergleich von Tumorparametern nach chemisch induzierter Kanzerogenese.

Sowohl beim tumorfreien Überleben (a) als auch beim Gesamtüberleben (b) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der p53^{WT}- und der p53^{SA}-Maus (p (a) = 0,3294; p (b) = 0,5484). n (p53^{WT}-Maus) = 14; n (p53^{SA}-Maus) = 13. Log-rank Test. (c) Die weitergehende Analyse der Tumoren durch den Vergleich von Tumorgewicht und Tumormgröße zeigt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Tumorgewicht $p = 0,21$; Tumormgröße $p = 0,7386$). n (p53^{WT}-Maus) = 13; n (p53^{SA}-Maus) = 12. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Für die statistischen Analysen wurden jeweils Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

7.3 CRISPR-induzierte *Eml4-Alk*-Aktivierung zur Generierung von NSCLCs

In den nachfolgenden Experimenten sollte die Tumorigenese und der Tumorprogress anhand von *non-small-cell lung cancer* (NSCLCs) untersucht werden. Diese Tumorentität wird unter anderem durch das onkogene Fusionsgen *Eml4-Alk* induziert. Zur Induktion dieses Onkogens wurde ein CRISPR-Cas9-Konstrukt verwendet, welches mithilfe eines adenoviralen Vektors durch eine intratracheale Infektion in die Lungenepithelzellen der Versuchstiere eingebracht wurde. Für das Monitoring und entsprechende Analysen sollte ein objektives und gleichzeitig tierschonendes Verfahren angewendet werden. Zu diesem Zweck wurden Luciferase-exprimierende transgene Mäuse verwendet. Zum einen kam die Gaussia-Luciferase (GLuc) zum Einsatz, die von den exprimierenden Zellen ins Blut sezerniert wird, sodass die Lumineszenzintensität mittels Luminometer nach Zugabe des Gaussia-Substrats (Coelenterazin) messbar ist. Zum anderen wurde die Firefly-Luciferase (FLuc) verwendet, die in den exprimierenden Zellen angereichert wird, sodass dessen Lumineszenz nach i.p.-Injektion von Luciferin mithilfe von Biolumineszenz-Imaging-Methoden ebenfalls messbar ist. Somit sollte die Tumorlast mittels GLuc-Messungen quantifiziert und mittels FLuc-Messungen genau lokalisiert werden können. Als Versuchstiere wurden dafür heterozygote $p53^{+/S180A}$ -Mäuse (siehe Abschnitt 7.2) mit $ROSA26^{LSL-GLuc}$ - oder $ROSA26^{LSL-FLuc}$ -Mäusen (B6.129-Gt(ROSA)26Sor^{tm2(ACTB-Luc)Tyj/Nci}) gekreuzt. Anschließend wurden die Tiere untereinander gekreuzt, sodass folgende Kohorten entstanden sind:

$p53^{S180A/S180A}$; $ROSA26^{LSL-GLuc/LSL-FLuc}$ und $p53^{+/+}$; $ROSA26^{LSL-GLuc/LSL-FLuc}$

Zur Induktion der NSCLCs wurde das rekombinante, replikationsdefiziente Adenovirus Ad-Cas9-Cre-Eml4-Alk-Virus verwendet. Dieses Virus enthält neben dem CRISPR/Cas9-Konstrukt zur Induktion des kanzerogenen *Eml4-Alk*-Fusionsgens das Gen für die Cre-Recombinase, um die LSL-Kassette vor dem *GLuc*- und dem *FLuc*-Gen der Versuchstiere zu entfernen (siehe Abb. 27). In der Folge ist sowohl die Expression der beiden Luciferasen als auch des *Eml4-Alk*-Fusionsgens jeweils nur in den erfolgreich infizierten Lungenepithelzellen zu erwarten gewesen.

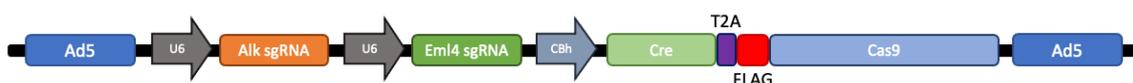
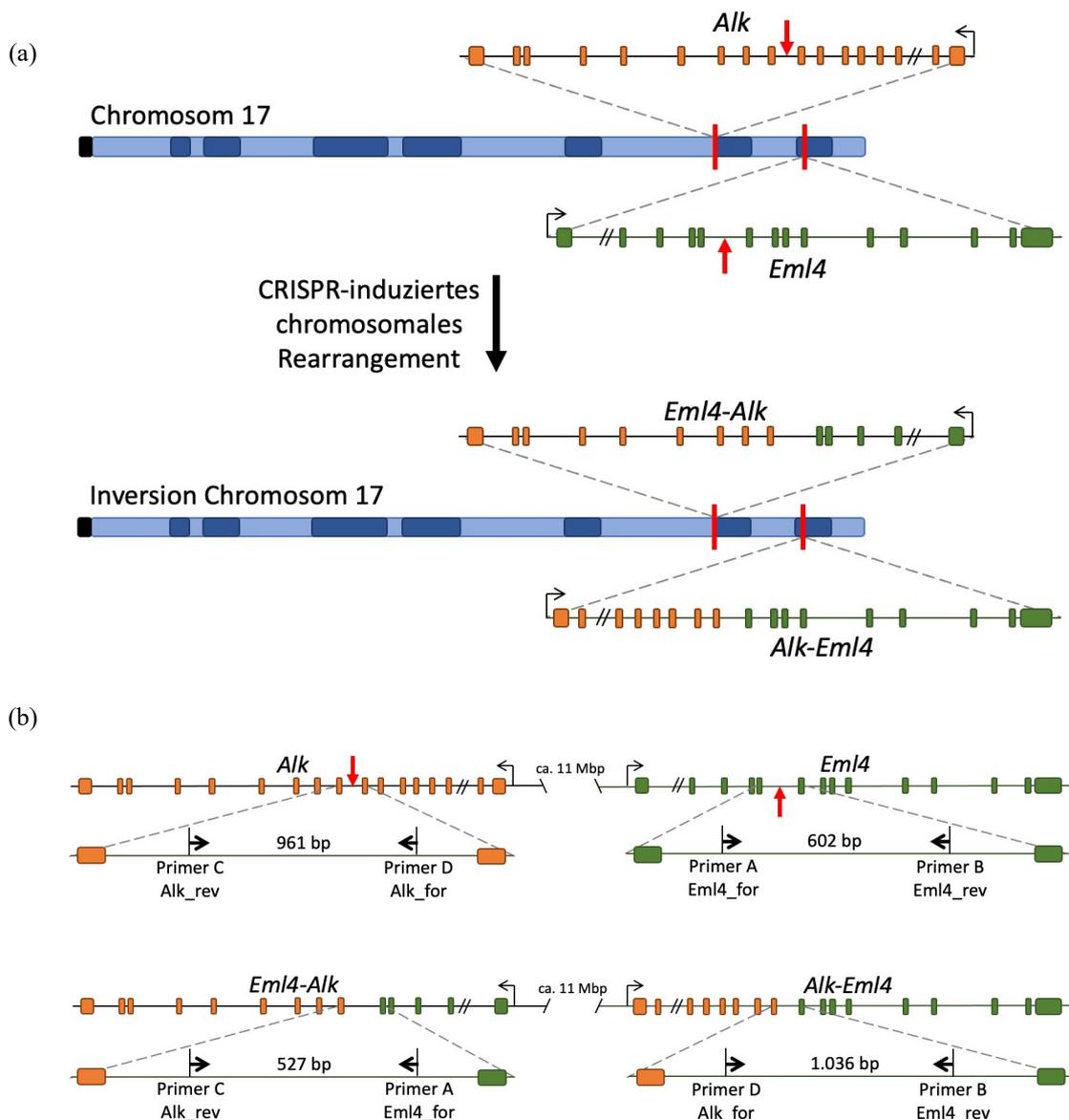


Abbildung 27: Genomische Struktur des pAd-Cas9-Cre-Eml4-Alk-Vektors.

Auf dem Vektor des verwendeten Adenovirus befinden sich die Kodierungssequenzen für das Cas9-Konstrukt sowie die beiden sgRNAs, um spezifisch innerhalb des *Alk*- und des *Eml4*-Genlokus zu schneiden. Zusätzlich ist ein Cre-T2A-Konstrukt vorhanden, welches für die Cre-Recombinase zur Exzision der LSL-Kassetten kodiert.

7.3.1 Das Ad-Cas9-Cre-Eml4-Alk-Virus induziert das *Eml4-Alk*-Fusionsgen *in-vitro*

Bevor das Virus zur Infektion *in-vivo* angewendet werden konnte, musste zunächst getestet werden, ob es murine Lungenepithelzellen infizieren und dort das gewünschte CRISPR-vermittelte chromosomale Rearrangement induzieren kann. Dafür schneiden die beiden sgRNAs auf Chromosom 17 innerhalb des *Alk*- und des *Eml4*-Gens (siehe Abb. 28a). Dies kann einerseits durch eine Inversion zur Entstehung des *Eml4-Alk*- (527 bp) und des *Alk-Eml4*-Fusionsgens (1.036 bp) führen, wobei *Eml4-Alk* durch sein onkogenes Potenzial Adenokarzinome vom NSCLC-Typ induzieren kann (siehe Abb. 28a & b). Daneben kann es allerdings auch zur Deletion des chromosomalen Abschnitts zwischen den beiden Schnittstellen kommen (siehe Abb. 28c).



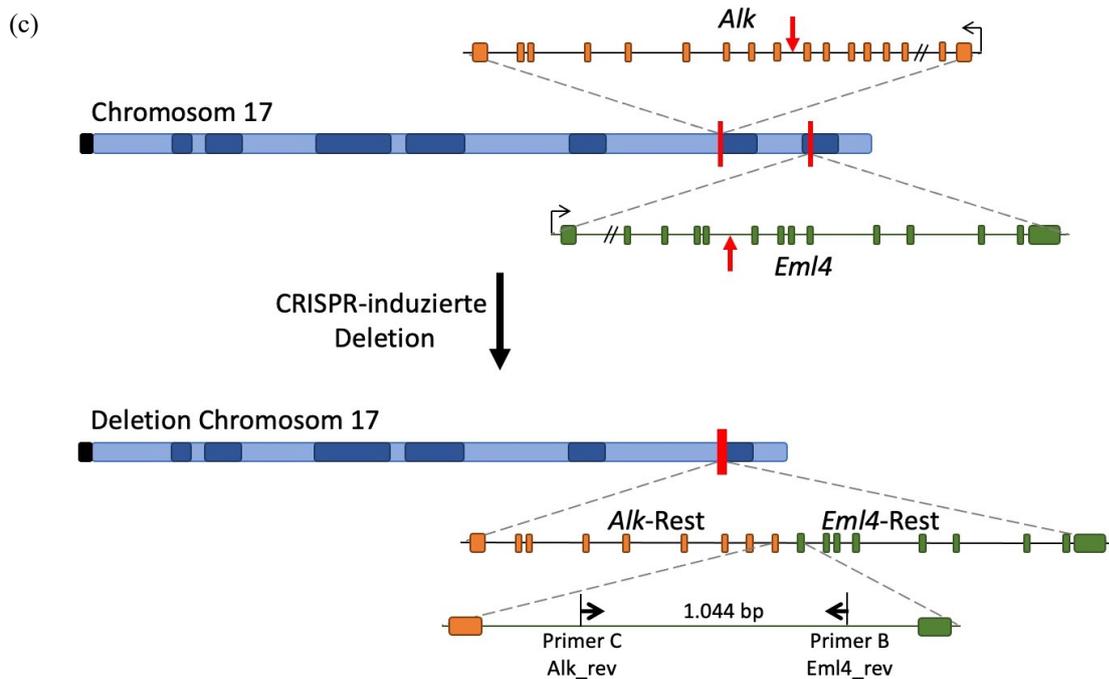


Abbildung 28: Schema des chromosomalen Rearrangements durch das Ad-Cas9-Cre-Eml4-Alk-Virus.

(a) Dargestellt ist das murine Chromosom 17 mit der Position des *Alk*- und des *Eml4*-Genlokus; die roten Pfeile signalisieren die Bindungsstellen der sgRNAs. Durch die Infektion mit dem Ad-Cas9-Cre-Eml4-Alk-Virus kann es zum chromosomalen Rearrangement im Sinne einer Inversion kommen. Dabei entstehen die Fusionsgene *Eml4-Alk* und *Alk-Eml4*. (b) Eine detailliertere Darstellung zeigt die Genloki nahe der CRISPR-vermittelten Schnittstellen sowie die Bindungsstellen der später verwendeten Primer (A bis D). Dabei amplifiziert das Primerpaar A und C einen Abschnitt des gewünschten onkogenen *Eml4-Alk*-Fusionsgens (527 bp) und das Primerpaar B und D einen Abschnitt des *Alk-Eml4*-Fusionsgens (1.036 bp). (c) Neben einer Inversion des chromosomalen Abschnitts ist auch eine Deletion des Bereichs zwischen den sgRNA-Bindungsstellen möglich. Diese spezifische Deletion lässt sich mit dem Primerpaar B und C durch die Amplifikation eines Fragments mit der Größe von 1.044 bp in der PCR nachweisen. Modifiziert nach Maddalo et al. (2014).

Die Methodik zum CRISPR-induzierten chromosomalen Rearrangement sollte zunächst *in-vitro* etabliert und die PCR-basierte Detektion des Fusionsonkogens getestet werden. Dafür wurden primäre, murine Lungenepithelzellen *in-vitro* mit unterschiedlichen Konzentrationen des Ad-Cas9-Cre-Eml4-Alk-Virus infiziert. Nach einer Infektionsdauer von 72 Stunden wurde die genomische DNA der Zellen isoliert und die möglichen Rearrangements mit spezifischen PCR-Analysen untersucht. Dafür wurden die Primerpaare wie in Abbildung 28 beschrieben verwendet. Abbildung 29 zeigt, dass das CRISPR/Cas9-Konstrukt unabhängig von der gewählten Konzentration das gewünschte *Eml4-Alk*-Fusionsgen (527 bp) und das *Alk-Eml4*-Fusionsgen (1.036 bp) in den verwendeten Lungenepithelzellen induzieren konnte. Das Fragment, welches bei der spezifischen Deletion amplifiziert wurde, war mit etwa 500 bp kleiner als erwartet (1.044 bp). Diese Beobachtung konnte in nicht dargestellten Experimenten

reproduziert werden. Ebenso erwiesen sich die gewählten PCR-Einstellungen als optimal, sodass mit diesen der Nachweis des *Eml4-Alk*-Fusionsgens aus den Lungentumoren der Versuchstiere möglich sein sollte (Test der Primer-Effizienz mittels q-RT-PCR siehe Anhang, Abb. 41). So war auch schon bei geringen Virusmengen der Nachweis des Fusionsgens sehr gut möglich, sodass eine weitere Zunahme der Bandenstärke aufgrund einer PCR-Sättigung nicht mehr zu beobachten war.

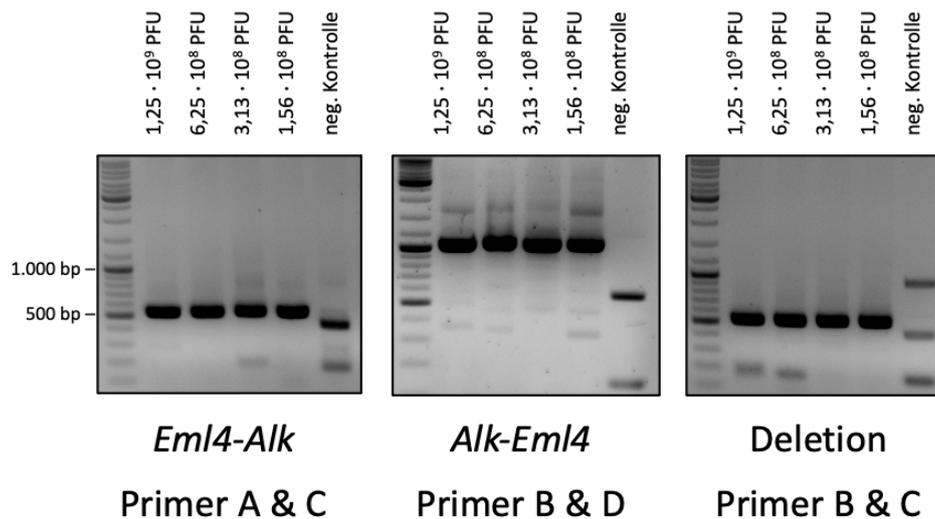


Abbildung 29: Gelelektrophorese zum Nachweis der Fusionsgene und der spezifischen Deletion.

Nach *in-vitro* Infektion der Lungenepithelzellen mit dem Ad-Cas9-Cre-Eml4-Alk-Virus wurden mittels spezifischer Primer die Fusionsgene und die Deletion durch eine PCR und anschließende Gelelektrophorese nachgewiesen. Die Größe der Fusionsgene entsprach dabei den zu erwartenden Werten, das amplifizierte Fragment im Rahmen der Deletion war kleiner als erwartet. Es wurden vier verschiedene Viruskonzentrationen getestet, die in der gezeigten Darstellung jeweils um den Faktor 2 von links nach rechts abnimmt. PFU = *plaque-forming unit*.

7.3.2 GLuc- und FLuc-Messungen ermöglichen teilweise den Nachweis und die Lokalisation von Tumoren

Nach den *in-vitro* Tests wurden anschließend insgesamt 43 Versuchstiere (22 p53^{WT}-Mäuse und 21 p53^{SA}-Mäuse) erfolgreich intratracheal mit dem Ad-Cas9-Cre-Eml4-Alk-Virus infiziert. Dies sollte einerseits das CRISPR-vermittelte chromosomale Rearrangement auslösen, wodurch das onkogene Fusionsgen *Eml4-Alk* entsteht und Tumoren vom NSCLC-Typ induziert. Andererseits sollte in den transgenen Versuchstieren, in denen unter anderem die ROSA26^{LSL-GLuc/LSL-FLuc}-Sequenz vorliegt, die Expression von *GLuc* und *FLuc* induziert werden. Daher enthielt das verwendete Ad-Cas9-Cre-Eml4-Alk-Virus das Gen für die Cre-Recombinase, die nach erfolgter Expression die LSL-Kassette vor den *GLuc*- und *FLuc*-Genen entfernt (siehe Abschnitt 7.3). Somit konnte ein objektives und tierschonendes Monitoring

zur Beobachtung von Tumorigenese und Tumorprogress gewährleistet werden, bevor die Tiere schließlich auf Genotyp-spezifische Unterschiede hin untersucht wurden.

Da die Gaussia-Luciferase von den exprimierenden Zellen ins Blut ausgeschüttet wird, wurde von 30 Versuchstieren ein- bis zweiwöchentlich Blut aus der Schwanzvene gesammelt. Die entnommenen Blutproben wurden anschließend mit dem Gaussia-Luciferase-Substrat Coelenterazin versetzt, um die Aktivität der Gaussia-Luciferase mittels Luminometer zu testen. Als *cut-off* Wert für die Tumorigenese wurde ein Anstieg der Gaussia-Aktivität über 2.500 RLU (*relative light units*) festgelegt. Der Verlauf der Gaussia-Aktivität wurde abschließend mit den histologischen Befunden der Mäuse verglichen. So war bei 11 von 30 Versuchstieren ein Tumorgeschehen und dessen -progress zu beobachten (RLUs > 2.500), während bei den restlichen Tieren keine zunehmende Gaussia-Aktivität messbar war (siehe Abb. 30). Bei wenigen Tieren war das Gaussia-Signal sogar um den Faktor 10 bis 20 im Vergleich zu den anderen Gaussia-positiven Versuchstieren erhöht. Hier korrelieren die Gaussia-Messungen mit den histologischen Befunden in Form von besonders ausgeprägten Lungentumoren. Von den 19 Gaussia-negativen Tieren konnte in späteren Untersuchungen (histologische Analysen) jedoch nur bei sechs Mäusen das Fehlen von Tumoren bestätigt werden. Insgesamt sind in dieser Versuchsgruppe also bei 24 Mäusen Tumoren aufgetreten, wobei mit etwa 54% (13 von 24) mehr als die Hälfte der Mäuse mit Lungentumoren nicht mittels Gaussia-Monitoring identifiziert werden konnte.

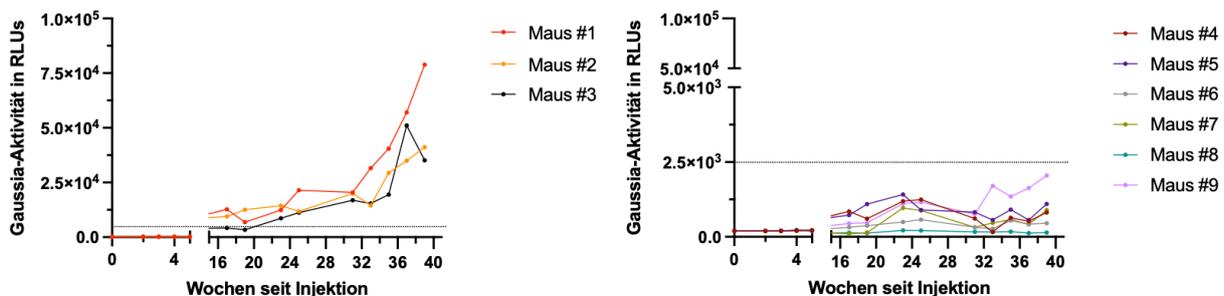


Abbildung 30: Gaussia-Luciferase-Aktivität nach Ad-Cas9-Cre-Eml4-Alk-Infektion.

Repräsentative Abbildungen. Die Gaussia-Aktivität ist in RLU (*relative light units*) gegen die Zeit seit der intratrachealen Infektion in Wochen aufgetragen. Die Messung erfolgte in zuvor abgenommenem Blutplasma der Mäuse nach Zugabe von Coelenterazin im Luminometer. Die gestrichelte Linie stellt jeweils den *cut-off* Wert von 2.500 RLU dar, ab dem von einer Tumorigenese ausgegangen wurde. Links werden drei repräsentative Mäuse (#1 bis #3) dargestellt, die eine Zunahme der Gaussia-Aktivität zeigten und Lungentumoren aufwiesen. In der rechten Grafik werden sechs Mäuse dargestellt, die im gesamten Versuchszeitraum Gaussia-negativ blieben. Bei den Mäusen #4 bis #6 waren auch bei der Sektion und in der Histologie keine Tumoren detektierbar. Die Mäuse #7 bis #9 wiesen trotz eines negativen Gaussia-Signals Lungentumoren auf. Das Monitoring der Tumorigenese und des Tumorprogresses anhand der Gaussia-Aktivität war somit nur eingeschränkt möglich.

Die gleichen Versuchstiere wurden im Verlauf zu zwei verschiedenen Zeitpunkten auf die Aktivität der Firefly-Luciferase hin untersucht. Die Firefly-Luciferase wird von den exprimierenden Zellen nicht ins Blut ausgeschüttet, sondern akkumuliert innerhalb der entsprechenden Zellen. Daher wurden die Versuchstiere narkotisiert und das Firefly-Luciferase-Substrat Luciferin intraperitoneal injiziert, um anschließend die Aktivität der Firefly-Luciferase mithilfe des Biolumineszenz-Imagings (BLI) zu messen. Die Firefly-Luciferase-Aktivität war bei 18 der 30 gemessenen Versuchstiere im BLI detektierbar. Bei diesen Mäusen war eine genaue Lokalisation der Tumoren im Thorax möglich und von anderen versehentlich infizierten und somit Gaussia-Luciferase-exprimierenden Zellen oder Geweben zu unterscheiden. Durch die zweifache Messung der Firefly-Luciferase-Aktivität konnte ebenfalls ein Tumorprogress visualisiert werden (siehe Abb. 31). Allerdings blieben auch hier manche Tiere unentdeckt, die einen Lungentumor hatten. Da abschließend bei insgesamt 24 Versuchstieren mittels histologischer Untersuchungen Tumoren entdeckt wurden, sind somit 25% (6 von 24) der Mäuse mit Lungentumoren bei den BLI-Analysen unentdeckt geblieben.

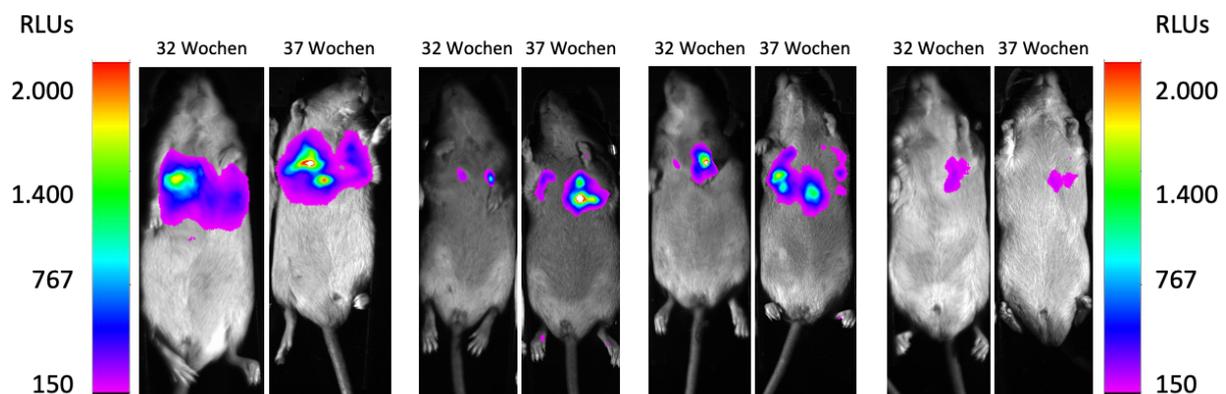


Abbildung 31: Firefly-Luciferase-Aktivität nach Ad-Cas9-Cre-Eml4-Alk-Infektion.

Repräsentative Abbildung. Die vier dargestellten Mäuse wurden jeweils 32 Wochen (linkes Bild) und 37 Wochen (rechtes Bild) nach der intratrachealen Infektion mittels BLI untersucht. Die Messung erfolgte in Isofluran-Narkose zehn Minuten nach i.p.-Injektion von D-Luciferin. Die Expositionszeit betrug 60 Sekunden. Durch die Expression der Firefly-Luciferase in den epithelialen Lungentumorzellen ist eine genaue Lokalisation der Tumoren im Thorax möglich. Alle abgebildeten Versuchstiere wiesen später bei der Sektion bzw. bei der histologischen Analyse Lungentumoren auf.

Während bei dem Monitoring mittels Gaussia-Luciferase mehr als die Hälfte der Mäuse mit Lungentumoren unentdeckt blieb, waren es bei den BLI-Analysen nur ein Viertel der Versuchstiere. Demnach scheint die Messung der Firefly-Luciferase im direkten Vergleich die bessere Methode zu sein, um die Tumorigenese und den Tumorprogress zu beobachten. Interessanterweise zeigten alle Gaussia-negativen Mäuse mit einem Lungentumor eine erhöhte

Aktivität des Firefly-Signals, was die Überlegenheit dieser Methodik unterstreicht. Somit gab es eine Gruppe von sechs Versuchstieren mit histologisch nachgewiesenem Lungentumor, die weder bei der Chemolumineszenz-Messung noch im BLI erkannt wurden. Umgekehrt zeigte jedoch keine tumorfreie Maus ein Gaussia- oder Firefly-Signal, sodass es keine falsch-positiven Versuchstiere gab.

7.3.3 Lungentumoren sind zuverlässig durch μ MRT-Messungen detektierbar

Zum Vergleich der Chemolumineszenz-Messung und dem BLI-Verfahren mit herkömmlichen Imaging-Methoden wie schnittbildgebenden Untersuchungen wurden 13 Versuchstiere auch mittels Kleintier-MRT analysiert. Die Messung fand jeweils 4,5 und 6,5 Monate nach der intratrachealen Infektion statt. In den Untersuchungen waren bei insgesamt zehn Mäusen Lungentumoren detektierbar (siehe Abb. 32). In der anschließenden histologischen Analyse zeigte sich, dass dabei kein Tumor übersehen wurde und somit alle Mäuse mit Tumoren korrekt erkannt wurden. Außerdem ist analog zu Chemolumineszenz- und BLI-Untersuchungen ein Tumorprogress deutlich erkennbar.

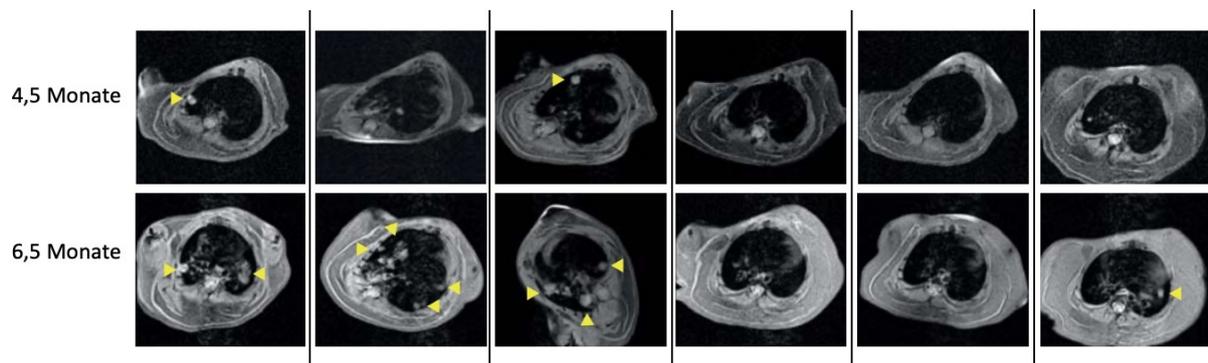


Abbildung 32: Kleintier-MRT zum Nachweis CRISPR-induzierter Lungentumoren.

Es wurden 4,5 und 6,5 Monate nach der intratrachealen Ad-Cas9-Cre-Eml4-Alk-Infektion Kleintier-MRTs bei 13 Versuchstieren durchgeführt. Die gelben Pfeile kennzeichnen detektierbare Lungentumoren. Die MRT-Bilder zu beiden Messzeitpunkten gehören jeweils zur gleichen Maus. Dargestellt sind repräsentative Schnitte.

7.3.4 Das onkogene *Eml4-Alk*-Fusionsgen ist auch *in-vivo* induzierbar

Der Endzeitpunkt des Tierversuchs wurde anhand der Scoresheets definiert (siehe Anhang, Abb. 38-40). Dafür wurden die Tiere mindestens einmal wöchentlich auf die Parameter Allgemeinverhalten, Aussehen, körperliche Verfassung (BCS = *body condition score*), Atmung und Tumorgröße hin untersucht, wobei für jede Kategorie bei unauffälligen Tieren null Punkte vergeben wurden und maximal bis zu drei Punkte möglich waren. Bei Erreichen eines Scores von drei Punkten in einer einzelnen Kategorie oder eines additiven Scores von sieben Punkten

wurden die Tiere sofort mittels zervikaler Dislokation getötet. Das Auftreten absoluter Abbruchkriterien (z. B. Aszitis, Rektumprolaps, Automutilation) führte ebenfalls zum sofortigen Versuchsabbruch für das betroffene Tier. Zum Ende des Versuchs nach 60 Wochen wurden alle verbliebenen Tiere getötet.

Um nachzuweisen, dass in den induzierten Lungentumoren, die bei den Mäusen gefunden wurden, tatsächlich das *Eml4-Alk*-Fusionsgen vorliegt, wurde von acht Versuchstieren nach der Sektion jeweils die Hälfte der Lunge lysiert und die genomische DNA isoliert. Mit dieser erfolgte anschließend der Nachweis des *Eml4-Alk*-Fusionsgens mittels PCR und Gelelektrophorese wie zuvor beschrieben (siehe Abschnitt 7.3.1). Neben den acht Versuchstieren (#1 bis #8), die mit dem gleichen Ad-Cas9-Cre-Eml4-Alk-Virus infiziert wurden, sind zwei weitere Versuchstiere (#9 und #10) nicht infiziert worden. Die Kontrollen stellten primäre, murine Lungenepithelzellen dar, die mit dem gleichen Virus *in-vitro* infiziert wurden (#11; +) bzw. nicht infiziert wurden (#12; -). Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben nach der PCR zeigt, dass sowohl in den nicht infizierten Mäusen (#9 und #10) als auch in den nicht infizierten Lungenepithelzellen (#12) das Fusionsgen nicht amplifiziert werden konnte. Die infizierten Zellen wiederum zeigten ein deutliches positives Signal als Nachweis des *Eml4-Alk*-Fusionsgens. Bei den intratracheal infizierten Versuchstieren konnten in den meisten untersuchten Proben (#3 bis #8) das *Eml4-Alk*-Fusionsgen ebenfalls amplifiziert werden (siehe Abb. 33). Somit konnte nach der Testung der Primer und der PCR-Einstellungen *in-vitro* das gewünschte chromosomale Rearrangement durch das Ad-Cas9-Cre-Eml4-Alk-Virus auch *in-vivo* bestätigt werden.

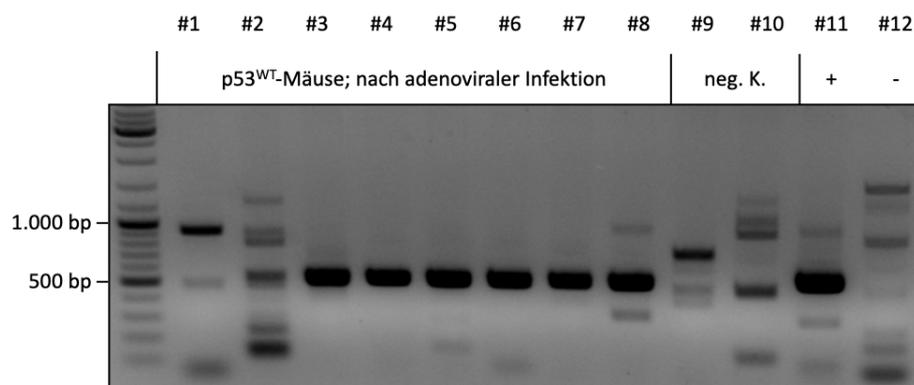


Abbildung 33: Gelelektrophorese zum Nachweis des *Eml4-Alk*-Fusionsgens aus Lungengewebe der Versuchstiere.

Bei acht Versuchstieren, die mit dem Ad-Cas9-Cre-Eml4-Alk-Virus intratracheal infiziert wurden, ist gDNA aus dem Lungengewebe isoliert und mittels PCR das Fusionsgen *Eml4-Alk* (527 bp) amplifiziert worden. Die Proben #1 bis #8 stellen demnach PCR-Produkte von p53^{WT}-Mäusen aus der Versuchsreihe dar. Die Proben #9 und #10 dienen als negative Kontrolle (neg. K.) und stammen aus identischen Mäusen, bei denen keine adenovirale Infektion durchgeführt wurde. Die Proben #11 und #12 wurden aus primären, murinen Lungenepithelzellen gewonnen, die *in-vitro* mit dem gleichen Virus infiziert wurden (#11; +) bzw. nicht infiziert wurden (#12; -).

7.3.5 Die *phospho-deficient* p53^{SA}-Maus zeigt eine geringere Tumoralast

Für die Genotyp-spezifische Analyse der Tumorigenese wurden alle Versuchstiere nach Erreichen des Endzeitpunktes auf Lungentumoren untersucht. Dabei war die Unterscheidung in p53^{WT}-Mäuse, die Wildtyp-p53 exprimieren, und in p53^{SA}-Mäuse, die die *phospho-deficient* p53-Mutante exprimieren, notwendig. Die Zusammenfassung von MRT-Untersuchungen, Sektionsergebnissen und Histologie-Analysen der Versuchstierlungen ergab demnach, dass alle 22 p53^{WT}-Mäuse (100%) und 12 der 21 p53^{SA}-Mäuse (57,1%) einen Lungentumor aufwiesen (siehe Abb. 34). Damit war die Tumorigenese bei den *phospho-deficient* exprimierenden p53^{SA}-Mäusen mit hoher Signifikanz geringer als bei den p53^{WT}-Mäusen ($p < 0,0001$).

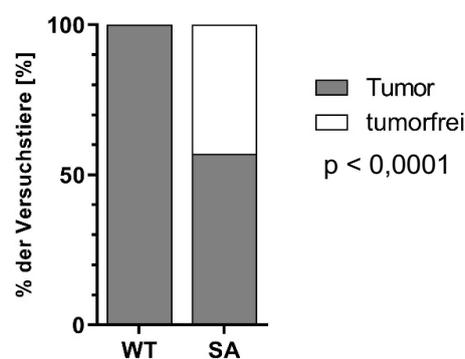


Abbildung 34: Häufigkeit von Tumoren im Vergleich zwischen p53^{WT}- und p53^{SA}-Mäusen.

Mäuse mit Tumoren, die mittels MRT-Untersuchungen, postmortaler Sektion und histologischer Untersuchungen identifiziert wurden, sind in diese Analyse eingeflossen. Demnach sind bei etwa doppelt so vielen p53^{WT}-Mäusen im Vergleich zu den p53^{SA}-Mäusen Lungentumoren detektierbar gewesen. Chi-Quadrat-Test, $p < 0,0001$, n (p53^{WT}-Maus) = 22, n (p53^{SA}-Maus) = 21.

Von allen Versuchstieren ist das Lungengewebe histologisch aufgearbeitet und eine H.-E.-Färbung durchgeführt worden. Das Ausmaß der Genotyp-spezifischen Tumoralast sollte anschließend anhand von histologischen Untersuchungen quantifiziert werden. Dafür ist von jeweils zwölf Mäusen pro Genotyp (p53^{WT} und p53^{SA}) für je einen repräsentativen Schnitt pro Maus in H.-E.-Färbung die Fläche des Tumorgewebes im Verhältnis zum gesunden Lungengewebe bestimmt (siehe Abb. 35a). Daraus ergab sich bei den untersuchten Proben eine durchschnittliche Tumorfläche von 14,25% bei den p53^{WT}-Mäusen im Gegensatz zu 3,37% bei den p53^{SA}-Mäusen (siehe Abb. 35b). Die statistische Analyse mittels Mann-Whitney-U-Test ergibt somit eine signifikante Divergenz ($p = 0,0207$).

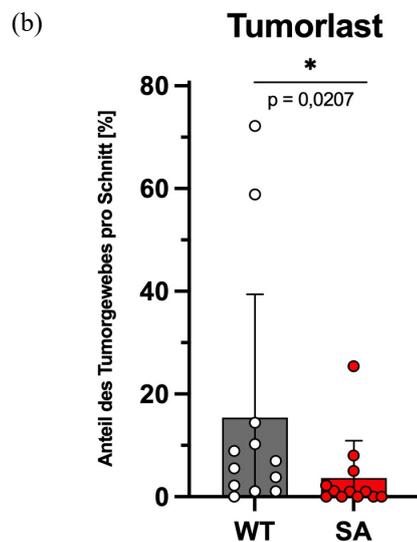
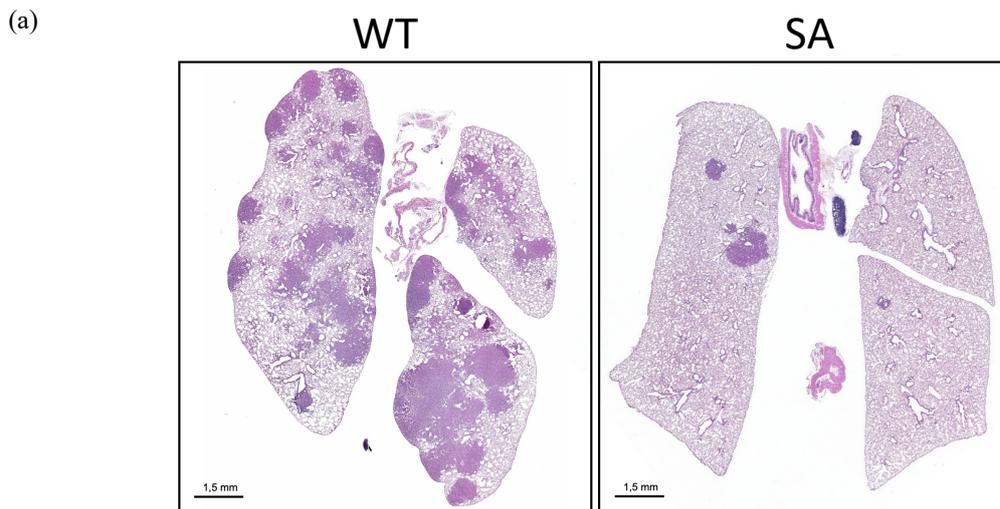


Abbildung 35: Histologische Auswertung der Tumorlast.

(a) Anhand der histologischen Schnitte in H.-E.-Färbung wurde der Anteil der Tumorfläche pro Schnitt im Verhältnis zum gesamten, abgebildeten Lungengewebe bestimmt. Repräsentative Abbildungen der Lungenschnitte. (b) Daraus ergab sich die quantitative Darstellung mit $n(p53^{WT}\text{-Maus}) = 12$ und $n(p53^{SA}\text{-Maus}) = 12$. Jeder Punkt stellt den Anteil des Tumorgewebes am untersuchten Präparat für jeweils einen Schnitt dar. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Mann-Whitney-U-Test.

Somit zeigte sich bei der $p53^{SA}$ -Maus sowohl bezüglich des generellen Auftretens von Lungentumoren nach *Eml4-Alk*-Induktion als auch bei der Analyse der Genotyp-spezifischen Tumorlast ein signifikant erhöhter tumorsuppressiver Effekt gegenüber der $p53^{WT}$ -Maus.

7.3.6 Vergleichbare Aktivität der spezifischen Malignitätsmarker bei immunhistochemischen Untersuchungen

Um mögliche Ursachen der signifikant erhöhten Tumorsuppression der p53^{SA}-Maus zu untersuchen, sollten immunhistochemische Färbungen der histologisch aufgearbeiteten Proben durchgeführt werden. Dabei konnte die Expression des *Eml4-Alk*-Fusionsgens indirekt nachgewiesen werden, indem eine IHC-Färbung des *Eml4-Alk*-Aktivitätsmarkers p-ERK (*phospho-extracellular signal-regulated kinase*) in den Lungenpräparaten der Mäuse erfolgte (siehe Abb. 36a). Das *Eml4-Alk*-Onkogen ist außerdem stark proliferationsfördernd, sodass auch eine Ki-67-Färbung zum Nachweis von proliferierenden Zellen durchgeführt wurde (siehe Abb. 36b). Diese immunhistochemischen Färbungen wurden an den Proben der Lungengewebe von jeweils sechs Mäusen pro Genotyp durchgeführt. Eine anschließende Quantifizierung dieser beiden Färbungen anhand des Tumorgewebes ermöglichte einen direkten Vergleich. Hier zeigte sich sowohl bei der p-ERK-Färbung als auch bei der Ki-67-Färbung eine vergleichbare Aktivität zwischen den untersuchten Tumoren der p53^{WT}- und der p53^{SA}-Mäuse (p (p-ERK-Färbung) = 0,3173; p (Ki-67-Färbung) = 0,9278). Demnach liegt in den untersuchten Tumoren beider Genotypen ein ähnlicher histologischer Tumorgrad vor. Wenn durch das *Eml4-Alk*-Fusionsgen erfolgreich ein Tumor induziert wurde, scheint der Genotyp keinen signifikanten Einfluss mehr auf die Aktivität des Onkogens oder auf das generelle Proliferationsniveau der entarteten Zellen zu haben.

Weiterhin sind starke Unterschiede der Signale im Vergleich von Adenomen zu Adenokarzinomen zu sehen. Dies lässt sich anhand der Akkumulation von p-ERK unterscheiden, da ERK in Adenokarzinomen deutlich häufiger im phosphorylierten Zustand vorliegt als in Adenomen. In der Abbildung 36 sind dafür pro Schnitt jeweils zwei Bereiche vergrößert dargestellt, die den Unterschied zwischen Adenomen und Adenokarzinomen anhand der immunhistochemischen Färbung visualisieren. So ist, wie zu erwarten, in den Regionen mit einem erhöhten p-ERK-Proteinlevel auch der Anteil proliferierender Zellen, sichtbar durch die Ki-67-Färbung, bei beiden Genotypen deutlich erhöht.

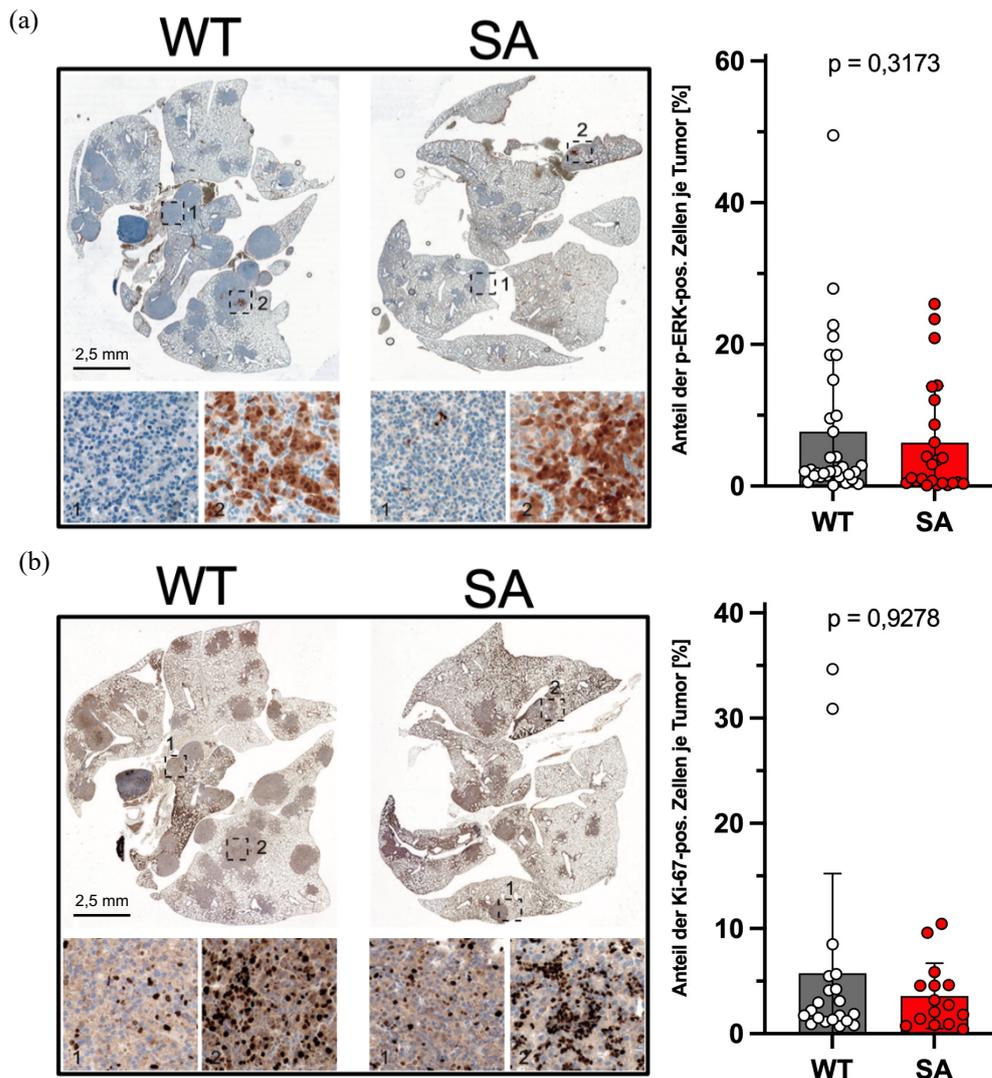


Abbildung 36: Immunhistochemische Färbung der Lungenpräparate.

Repräsentative histologische Abbildungen. Es erfolgten immunhistochemische Färbungen gegen p-ERK **(a)** und Ki-67 **(b)**. Bei den kleinen Abbildungen stellt das linke Bild (1) jeweils die Vergrößerung eines Adenoms und das rechte Bild (2) jeweils die Vergrößerung eines Adenokarzinoms dar. Die Färbungen sind mittels des *Positive Pixel Count Algorithm v9* quantifiziert worden. Es wurden Proben von $n = 6$ Mäusen pro Genotyp untersucht, wobei die Quantifizierung für alle detektierbaren Tumoren je Probe durchgeführt wurde. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Für die statistischen Analysen wurden jeweils Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

8 Diskussion

Der Tumorsuppressor p53 steht im Mittelpunkt der tumorprotektiven Funktionen einer Zelle. Dies wird dadurch deutlich, dass *TP53* in über der Hälfte aller humanen Tumoren mutiert ist. Gleichzeitig ist ein mutiertes *TP53* mit einer schlechteren Prognose hinsichtlich des Überlebens bzw. des Krankheits-freien Überlebens in einer Vielzahl von Tumoren assoziiert (V. D. Li et al., 2019). Bei der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren spielt wiederum eine fehlregulierte Apoptose eine entscheidende Rolle, die neben dem Zell-Zyklus-Arrest und der Seneszenz zu den zentralen Funktionen von p53 gehört (Elmore, 2007). Alle drei Mechanismen werden durch DNA-Schäden aktiviert, die beispielsweise durch ionisierende Strahlung oder DNA-schädigende Substanzen hervorgerufen werden. Bei zunehmender Schwere der DNA-Schädigung werden schließlich vermehrt Apoptose-Signalwege hochreguliert, um Zellen, die aufgrund von akkumulierten genomischen Schäden möglicherweise in eine maligne Transformation übergehen, zu eliminieren (D'Arcy, 2019). Aber wie genau entscheidet p53, ob vermehrt Gene für den reversiblen Zell-Zyklus-Arrest zur Reparatur von DNA-Schäden oder pro-apoptotische Gene zur Eliminierung der Zelle exprimiert werden?

Zur Aktivierung pro-apoptotischer Gene muss zunächst ein apoptotischer Schwellenwert überschritten werden, der unter anderem von der Intensität und Dauer der p53-Expression abhängig ist (Kracikova et al., 2013), da es mit einem zunehmenden p53-Proteinlevel in den Zellen aufgrund der Interaktion der Oligomerisations-Domänen vermehrt zur Tetramerisierung kommt (Clore et al., 1994; W. Lee et al., 1994). In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass in Bezug auf die Expression pro-apoptotischer Gene ausschließlich tetrameres p53 ein zu WT-p53 vergleichbares Niveau dieser Gene induzieren kann. P53-Dimere sind nur in der Lage einen Zell-Zyklus-Arrest zu induzieren, während p53 als Monomer funktionell inaktiv ist (N. W. Fischer et al., 2016). Darüber hinaus steckt ein weiterer Teil der Antwort auf diese Frage in der DNA-Bindungs-Kooperativität, die an der Feinregulierung dieses Schwellenwertes beteiligt ist. Bei der DNA-Bindungs-Kooperativität des p53-Tetramers spielen die Salzbrücken zwischen den H1-Helices (AS 177-182) innerhalb der DBDs der einzelnen Moleküle eine entscheidende Rolle. Mit zunehmend stärkeren elektrochemischen Wechselwirkungen zwischen den H1-Helices steigt auch die DNA-Bindungs-Kooperativität und der Schwellenwert zur Initiierung der Apoptose sinkt. Dadurch werden verstärkt pro-apoptotische Gene aktiviert (Schlereth et al., 2010; Timofeev et al., 2013). In direkter Nachbarschaft zur H1-Helix befinden sich die beiden Serinmoleküle 183 und 185 (entsprechen dem murinen Serin 180). Zumindest Ser183 ist nachweislich häufig das Ziel von Phosphorylierung (DeHart et al., 2014), sodass aufgrund der sterischen Modifikation und der negativen Ladung durch die

eingebraachte Phosphatgruppe möglicherweise ein relevanter Einfluss auf die DNA-Bindungs-Kooperativität besteht. In der vorliegenden Arbeit wurden daher sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* p53-vermittelte Reaktionen auf verschiedene DNA-schädigende Einflüsse untersucht. Dafür wurden *in-vivo* p53^{SA}-Mäuse mit p53^{WT}-Mäusen als Kontrolle in Bezug auf ihre tumorsuppressive Aktivität untersucht, indem Tumoren durch chemische Kanzerogene oder CRISPR-generierte Fusionsonkogene induziert wurden. Der Effekt der Phospho-Mutanten wurde allerdings nicht nur in murinen Tumormodellen, sondern aufgrund einer erhöhten klinischen Relevanz auch in humanen Krebszellen untersucht. Dafür wurden in humanen Kolonkarzinomzellen *phospho-mimic* und *phospho-deficient* Mutationen an Ser183 und Ser185 eingebracht. In den folgenden *in-vitro*-Experimenten sind diese Zellen anschließend mit der genotoxischen Substanz Doxorubicin behandelt worden und hinsichtlich ihrer Apoptoserate und ihrer molekularen Expressionsantwort analysiert worden.

8.1 Potenzielle Einflüsse der experimentellen Techniken

8.1.1 Chemische Induktion von Fibrosarkomen

Die ersten Tumoren traten bei der chemischen Kanzerogenese nach etwa elf Wochen auf, während wenige Versuchstiere sogar fast 300 Tage tumorfrei blieben. Das mittlere tumorfreie Überleben war bei beiden Genotypen mit 122 Tagen identisch. Bezüglich des mittleren Gesamtüberlebens war dieses bei den p53^{SA}-Mäusen mit 149 Tagen zu 154 Tagen bei den p53^{WT}-Mäusen minimal geringer. In Bezug auf das durchschnittliche Gewicht und die durchschnittliche Größe der exzidierten Tumoren gab es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen.

Der optimale Versuchsaufbau der chemischen Kanzerogenese stellte sich aus verschiedenen Gründen als besonders anspruchsvoll heraus. So ist es nicht gelungen wie *García-Cao et al.* eine Konzentration von 3-MC, gelöst in Sesamöl, von 25 µg/µL zu erreichen, um den Mäusen insgesamt 1 mg 3-MC in einem Gesamtvolumen von 40 µL zu injizieren. Aufgrund der schlechten Löslichkeit konnte lediglich eine Konzentration von 10 µg/µL erzielt werden, sodass ein Volumen von 100 µL injiziert werden musste. Durch das 2,5-fach erhöhte Gesamtvolumen war eine zielgenaue s.c.-Injektion in die hinteren Oberschenkel deutlich erschwert, weil die Applikation möglicherweise nicht vollständig ins subkutane Gewebe, sondern teilweise auch intramuskulär oder intraperitoneal erfolgte (Zufallsbefunde bei Sektionen). Es ist daher denkbar, dass die höhere lokale Konzentration des Karzinogens auch die beschleunigte Tumorzinzidenz bei *García-Cao et al.* erklärt. Dort wurden zwar vergleichbare

Tumorinzidenzen von etwa zwölf Wochen bis zum ersten Tumorereignis und etwa 20 Wochen bis zu einer Inzidenz von ca. 50% festgestellt. Allerdings gingen die Tumoren dort erst ab einer Größe von 1,5 cm im Durchmesser in die Inzidenz mit ein, während in dieser Arbeit bereits ab einer Größe von 0,5 cm im Durchmesser das Abbruchkriterium erreicht war (García-Cao et al., 2002). In diesem Maße deutlich kleinere Tumoren lassen sich darüber hinaus auch nur erschwert durch das vergleichsweise dicke Mäusefell tasten und zuverlässig messen. Alternativ wäre eine Injektion in die Flanke statt ins Bein wie bei *Wakita et al.* aufgrund weniger Muskelmasse und mehr subkutanem Fettgewebe eventuell sinnvoller gewesen, da dort sogar 500 µg von 3-MC bei einer Konzentration von 5 µg/µL zu einer 100%-igen Tumorinzidenz nach etwa 20 Wochen führte. Allerdings sind in dieser Studie auch vier bis sechs Wochen alte Tiere verwendet worden, während die Tiere in dieser Arbeit zum Zeitpunkt der Injektion bereits zwischen 15 und 20 Wochen alt waren (Wakita et al., 2009). So gibt es auch Hinweise darauf, dass bei bestimmten Tumorentitäten das Tumorwachstum in jungen Patienten gegenüber älteren Patienten beschleunigt sein kann (Weksler et al., 1990). Ob dies ebenfalls auf das Fibrosarkom zutrifft, ist noch nicht untersucht worden. Auf der anderen Seite konnten in der zugrundeliegenden Arbeit vergleichbare Tumorinzidenzen wie bei *Reddy & Fialkow* durch die Injektion von 2 mg des Karzinogens 3-MC, gelöst in 200 µL Olivenöl, gezeigt werden. Diese haben ebenfalls eine s.c.-Injektion in die hinteren Gliedmaßen vorgenommen, sodass eine zuverlässige Vergleichbarkeit vorliegt (Reddy & Fialkow, 1981). In der Zusammenschau dieser Studien sind die vorliegenden Ergebnisse hinsichtlich der Tumorinzidenz durch die chemische Kanzerogenese zuverlässig und vermutlich nicht durch einen fehlerhaften Versuchsaufbau verfälscht. Schließlich bleibt ein Einfluss des durch Züchtung und Modifikationen veränderten Genoms der verwendeten Versuchstiere nicht auszuschließen, da Unterschiede im genetischen Hintergrund auch zu unterschiedlichen Phänotypen beitragen (Doetschman, 2009). So könnten bei gleichem Versuchsaufbau Unterschiede in den Resultaten zumindest teilweise auf die Verwendung verschiedener Mauslinien zurückgeführt werden.

8.1.2 CRISPR-vermittelte Induktion von NSCLCs

Entgegen dem Tierversuch der chemischen Kanzerogenese konnten bei den CRISPR-induzierten NSCLCs signifikante Unterschiede zwischen den p53^{SA}- und p53^{WT}-Mäusen festgestellt werden. So war zum Endzeitpunkt bei allen p53^{WT}-Mäusen ein Tumor nachweisbar, während 42,9% der p53^{SA}-Mäuse tumorfrei blieben ($p < 0,0001$). Ebenso zeigte sich bei der Genotyp-spezifischen Tumormast, die durch das Verhältnis von Tumorgewebe zu gesundem Lungengewebe histologisch quantifiziert wurde, eine signifikante Divergenz ($p < 0,05$).

Die praktische Durchführung der Infektion für die CRISPR-induzierte Tumorigenese von NSCLCs in den p53^{SA}- und p53^{WT}-Mäusen erfolgte weitestgehend analog zum publizierten Protokoll von *DuPage et al.* (siehe Abb. 10) (DuPage et al., 2009). Dabei gibt es mit unterschiedlichen physikalischen Methoden sowie viralen und nicht-viralen Vektoren verschiedene Möglichkeiten, um das CRISPR/Cas9-Cre-Konstrukt in die epithelialen Lungenzellen einzuschleusen. Für *in-vivo* Applikationen hat sich der virale Transportvektor, insbesondere Lenti- und Adenoviren, als effizienteste Variante herausgestellt (Kabadi et al., 2014; Voets et al., 2017). Der Vorteil von Lentiviren besteht darin, dass Nukleinsäuren bis zu einer Länge von 10 kb transportiert werden können, während die maximale Kapazität von Adenoviren bei etwa 5 bis 6 kb liegt (Grieger & Samulski, 2005; Kalidasan et al., 2021; Z. Wu et al., 2010). Andererseits erfolgt bei einem lentiviralen Vektor die Integration der enthaltenen DNA ins Genom, sodass durch eine Umstrukturierung der Gene die Gefahr der epigenetischen Inaktivierung (*silencing*) besteht. Adenoviren hingegen können Lungenepithelzellen besonders effizient infizieren und schleusen dabei die Expressionskassetten für Cas9, die sgRNAs und die Cre-Recombinase transient in die Lungenepithelzellen ein (Lino et al., 2018). So könnte die dauerhafte Expression der Cre-Recombinase bei Verwendung eines lentiviralen Vektors zu zytotoxischen Effekten in Form eines G₂/M-Phase-Arrests führen (Pfeifer et al., 2001). Neben den verschiedenen Möglichkeiten des Transportvektors gibt es mit der intranasalen und der intratrachealen Infektion auch zwei Methoden, um die Viren in die Lunge einzubringen. Hier hat sich die intratracheale Infektion zwar als technisch anspruchsvoller, aber auch als effizienter und sicherer erwiesen (DuPage et al., 2009). Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit die intratracheale Infektion mit einem rekombinanten, replikationsdefizienten Adenovirus durchgeführt, um das CRISPR/Cas9-Cre-Konstrukt verlässlich und mit möglichst wenig unerwünschten Nebeneffekten transient in den Lungenepithelzellen zu exprimieren. Als Maustumormodell wurde eine Subgruppe der NSCLCs gewählt, die auf das onkogene *Eml4-Alk*-Fusionsgen als treibende Mutation zurückzuführen ist (Soda et al., 2007). Es wurde gezeigt, dass bei diesem Mutationsevent in NSCLCs eine p53-Mutation die häufigste Ko-Mutation darstellt und als stärkster prognostischer Faktor mit einer erheblichen Prognoseverschlechterung einhergeht (Aisner et al., 2018). Darüber hinaus ist diese Tumorsubgruppe klinisch besonders interessant, da sie eine Sensitivität gegenüber spezifischen ALK-Inhibitoren wie Crizotinib aufweist und daher gezielt therapiert werden kann (Kwak et al., 2010). *Maddalo et al.* hat bereits 2014 gezeigt, dass die Induktion des *Eml4-Alk*-Fusionsgens mittels CRISPR/Cas9 zur Erzeugung humaner NSCLCs *in-vivo* geeignet ist. Der Vektor mit dem Cas9-exprimierenden Plasmid wurde um die beiden sgRNAs erweitert, die auf

dem murinen Chromosom 17 in Intron 14 von *Eml4* und in Intron 19 von *Alk* schneiden, um die häufigste *EML4-ALK*-Variante der NSCLCs nachzubilden (Maddalo et al., 2014).

8.1.3 Die p53^{SA}-Maus zeigt eine ausgeprägte tumorsuppressive Aktivität bezüglich CRISPR-induzierter NSCLCs

Die Tumorzinzidenz zum Endzeitpunkt von 100% bei den p53^{WT}-Mäusen und die unter Abschnitt 7.3.4 gezeigten molekularbiologischen Untersuchungen bestätigten darüber hinaus das Vorliegen des *Eml4-Alk*-Fusionsgens, sodass von einer vollständigen Effizienz bei der intratrachealen, adenoviralen Infektion mit einem erfolgreichen Rearrangement ausgegangen werden kann. Durch die vollständige Effizienz der Infektion lässt sich auch das Ergebnis von 42,9% tumorfreien p53^{SA}-Mäusen zuverlässig interpretieren, sodass dem p53^{SA}-Genotyp in diesem Tumormodell eine ausgeprägte tumorsuppressive Aktivität zugesprochen werden kann. Dafür spricht außerdem, dass beim Vergleich der Lungentumoren der beiden Genotypen die p53^{WT}-Mäuse eine deutlich höhere Tumormasse aufzeigen. Dies wurde bei Mäusen, die zeitgleich den Endzeitpunkt erreicht haben, durch die mehr als 4-fach erhöhte Fläche an Tumorgewebe in den histologisch untersuchten Lungen gezeigt. Bezüglich der Tumorzinzidenz konnten *Maddalo et al.* neun Wochen nach der Infektion mit dem Cas9-Eml4-Alk-Adenovirus bei allen Mäusen mittels μ CT einen Lungentumor nachweisen. Da dort nur WT-Mäuse infiziert wurden, stimmen diese Daten mit den hier gezeigten Ergebnissen hinsichtlich der generellen Effizienz der Tumorigenese überein. Allerdings ist die frühe Inzidenz nicht vergleichbar, da die Lungentumoren symptomfreier Mäuse in der vorliegenden Arbeit, bei denen im ungünstigsten Fall weder eine Gaussia- noch eine Firefly-Aktivität messbar war, nicht detektiert wurden. Somit ist bei einem Teil der Versuchstiere unklar, wann die Tumorigenese stattgefunden hat. Auffällig war jedoch, dass bei den älteren Versuchstieren (etwa 22 bis 24 Wochen alt) die *in-vivo* nachgewiesenen Tumoren mit einer geringeren Latenz auftraten als bei den jungen Versuchstieren (etwa acht bis zehn Wochen alt). Dieser Zusammenhang wurde ebenso von *Parikh et al.* gezeigt, wobei der Altersunterschied der Mäuse in dieser Studie noch ausgeprägter war (Parikh et al., 2018). Die Effektivität des gewünschten chromosomalen Rearrangements ist sehr gering und wurde von *Maddalo et al.* auf etwa 3-4% geschätzt (Maddalo et al., 2014), da die beiden Schnittstellen der sgRNAs mit etwa 11 Mbp Abstand relativ weit auseinander liegen. Außerdem können neben dem gewünschten Fusions-Onkogen auch Deletionen, Inversionen und das reziproke Fusionsgen *Alk-Eml4* entstehen (Maddalo et al., 2014).

Der Fakt, dass einige Tumoren in der immunhistochemischen Analyse p-ERK-negativ sind, lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass in prä-malignen Adenomen im Gegensatz zu

Adenokarzinomen p-ERK nicht in detektierbaren Konzentrationen synthetisiert wird (Garnett et al., 2017). So führen allerdings auch Adenome aufgrund von Hyperplasie zu klinischen Symptomen, einer erhöhten Luciferase-Expression sowie zu detektierbaren Tumoren im μ MRT, sodass die Versuchstiere aufgrund des zuvor definierten Endzeitpunkts korrekt getötet wurden.

Insgesamt stellt das dargestellte Experiment eine hervorragende Möglichkeit dar, um die Fusionsonkogen-induzierten NSCLCs *in-vivo* authentisch zu untersuchen. Entgegen häufig angewandter Methoden exprimieren nicht die gesamte Lunge oder sogar der ganze Organismus das Fusionsonkogen, sondern nur vereinzelte, erfolgreich infizierte Zellen, bei denen zufällig das gewünschte Rearrangement stattgefunden hat. Damit lassen sich die Prozesse der Tumorigenese sowie der p53-vermittelten Tumorsuppression realitätsnaher darstellen.

8.1.4 Die Luciferase-Messungen zeigen nur eine eingeschränkte Korrelation mit dem Tumorprogress

Die *in-vivo* Imaging-Methoden der Chemo- und der Biolumineszenzmessung erwiesen sich nur als bedingt zuverlässig. Selbst bei kombinierter Anwendung dieser beiden Verfahren konnte bei jeweils 25% der p53^{SA}- und der p53^{WT}-Mäuse, die nachweislich einen Lungentumor hatten, kein Tumor detektiert werden. Im Kleintier-MRT wurden zum Vergleich insgesamt 13 Mäuse untersucht, von denen bei sechs von sechs p53^{WT}-Mäusen und bei vier von sieben p53^{SA}-Mäusen Tumoren entdeckt wurden. In der histologischen Analyse stellte sich heraus, dass mit dieser Methode alle Tumoren detektiert werden konnten und keiner übersehen wurde.

Grund für die Anwendung von Luciferase-Messungen war, ein besonders tierschonendes Monitoring zu gewährleisten. So wurde das Adenovirus von *Maddalo et al.* in dieser Arbeit um die Expressionskassette der Cre-Recombinase ergänzt. Die verwendeten Versuchstiere waren doppelt transgen für die Gaussia- (*GLuc*) und die Firefly-Luciferase (*FLuc*), die jeweils von LoxP-Stellen flankiert wurden. So fand nach der transienten Expression der Cre-Recombinase eine konstante Expression der beiden Luciferasen in den infizierten Zellen statt, die bei zunehmendem Signal theoretisch entsprechend *Inoue et al.* eine hohe Korrelation mit der Tumorlast aufweisen und eine genaue Lokalisation der Tumoren ermöglichen (Inoue et al., 2011). Die Verwendung Luciferase-transgener Versuchstiere hat den Vorteil, dass die Tumorigenese und die Tumorprogression *in-vivo* analysiert und quantifiziert werden können. So müssen keine Tiere in regelmäßigen Abständen getötet werden, um den Tumorprogress zu beobachten. Eine Schwierigkeit bei der Generierung transgener Mäuse ist allerdings, je nach Methode, die nicht fehlerfrei steuerbare Insertion des Transgens in das murine Genom. Hier

kann es zu ausgeprägten Variationen in der Expressionseffizienz kommen, da die Anzahl an integrierten Genkopien und der genaue Ort der Insertion unbekannt sind (Cheon & Orsulic, 2011). Daher wurde in dem zugrundeliegenden Tierversuch ein Mausstamm mit einer ROSA26-Reporter-Sequenz verwendet, der mithilfe einer homologen Rekombination in das murine Genom eingebracht wurde. Innerhalb dieser ROSA26-Reporter-Sequenz befand sich das Transgen, welches dort über die einzigartige Klonierungsstelle XbaI gezielt eingebracht werden konnte. Außerdem führt die Insertion des Transgens in den ROSA26-Genlocus zu einer ubiquitären, konstanten Expression während der gesamten Lebenszeit (Cheon & Orsulic, 2011). Zum Vergleich mit den Luciferase-Messungen wurden außerdem μ MRT-Untersuchungen durchgeführt. Diese weisen insbesondere bei der Bildgebung von Lungentumoren Schwierigkeiten auf, da das Lungengewebe über eine geringe Gewebedichte, einen niedrigen Wasseranteil und Variationen in der magnetischen Suszeptibilität verfügt (Schuster et al., 2004). Dennoch hat sich das MRT als hervorragende *in-vivo* Imaging-Methode herausgestellt, mit der sich sogar Lungentumoren nachweisen lassen, die eine Größe von weniger als 1 mm aufweisen (Garbow, 2004).

Bei der retrospektiven Analyse der Chemo- und Biolumineszenzdaten zeigte sich schließlich nur eine eingeschränkte Korrelation mit dem tatsächlichen Tumorwachstum. Da insgesamt 25% der Mäuse, die in der Histologie nachweislich einen Lungentumor hatten, nicht mit den Luciferase-Messungen erkannt wurden, stellt sich die Frage nach der möglichen Ursache. Für die Messung der Firefly-Aktivität wurde die optimale Zeitspanne von zehn Minuten zwischen der i.p.-Injektion von D-Luciferin und der BLI-Messung in Experimenten der Arbeitsgruppe zuvor ermittelt und auch durch Studien belegt (Inoue et al., 2010). Allerdings haben *Inoue et al.* auch gezeigt, dass die s.c.-Injektion der i.p.-Injektion mindestens ebenbürtig ist. Tatsächlich wurde in diversen Studien eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 2,9% bis knapp 10% bei der i.p.-Injektion durch ungewollte Applikation von D-Luciferin in den Darm berichtet (Baba et al., 2007; Inoue et al., 2008, 2009; Paroo et al., 2004), die in einer ausbleibenden Anreicherung im gesamten Organismus resultiert. Eine mögliche fehlerhafte i.p.-Injektion ist dennoch unwahrscheinlich, weil die Versuchstiere ohne detektierbare Lungentumoren wiederholt gemessen wurden und dauerhaft negativ blieben. Darüber hinaus gilt es zu bedenken, dass die Funktion von Cas9 und den sgRNAs unabhängig von der Cre-Recombinase-Funktion ist. Die Cre-Recombinase führt eigentlich sehr zuverlässig zur gewünschten Rekombination und Exzision der LSL-Kassetten, mit der Folge, dass die Gaussia- und Firefly-Luciferasen konstant exprimiert werden (Craig et al., 2015). So kann es aber auch durch Zufall dazu kommen, dass die Cre-Recombinase in manchen Zellen nicht korrekt funktioniert, CRISPR/Cas9 hingegen

schon. Die Folge wären Luciferase-negative, *Eml4-Alk*-positive Lungentumoren. Schließlich ist es am ehesten denkbar, dass die Luciferasen einen immunogenen Effekt auf den murinen Organismus haben. So wurde in dieser Arbeit mit immunkompetenten Mäusen gearbeitet, deren Immunsystem durch die adenovirale Infektion und die ektope Expression von Cre, Cas9 und den Luciferasen aktiviert wurde (DuPage et al., 2009; Radaelli et al., 2018). Während die Expression von Cas9 und der Cre-Recombinase nur transient erfolgte, hatte die Exzision der LSL-Kassette eine kontinuierliche Expression der beiden Luciferasen zur Folge. Zunehmende Proteinlevel der Luciferasen haben nachweislich eine immunogene Wirkung (Baklaushev et al., 2017; Jeon et al., 2007; Podetz-Pedersen et al., 2014), sodass die betroffenen Zellen in Kombination mit der Onkogen-Expression einem hohen Selektionsdruck unterlagen. Dieser Zustand wird vermutlich zu Luciferase-negativen Tumoren geführt haben. Unterstützt wird diese These dadurch, dass manche Tiere, die in der histologischen Untersuchung einen Lungentumor aufwiesen, zunächst eine zunehmende Gaussia-Aktivität zeigten. Im Verlauf ging diese jedoch verloren, sodass möglicherweise zunächst eine erfolgreiche Infektion stattgefunden hat, die stark Luciferase-exprimierenden Zellen allerdings vom Immunsystem eliminiert wurden. Das Resultat wären ebenfalls Luciferase-negative, *Eml4-Alk*-positive Lungentumoren. Es wurde nicht weitergehend untersucht, ob bei multiplen Tumoren in der Lunge einer Maus, manche Luciferase-negativ sind, während andere Tumoren die Luciferasen auf einem niedrigen Niveau exprimieren.

8.1.5 *In-vitro* Analysen humaner Karzinomzelllinien

Um die Ergebnisse aus den murinen Tumormodellen in einem klinisch relevanteren Rahmen zu untersuchen, wurden Untersuchungen mit humanen Zellen einer Kolonkarzinomzelllinie durchgeführt. Dafür sind $p53^{-/AA}$ - und $p53^{-/DD}$ -Zelllinien verwendet worden, die eine *phospho-deficient* und eine *phospho-mimic* Mutante darstellen. Es konnte sowohl auf Genexpressions-Ebene als auch auf Proteinebene gezeigt werden, dass die *phospho-deficient* exprimierenden $p53^{-/AA}$ -Zelllinien den $p53^{-/DD}$ -Zelllinien bezüglich der gemessenen Apoptose-Markern deutlich überlegen war. Auch in der *Live-Cell-Imaging*-Analyse konnte eine erhöhte Sterblichkeit der $p53^{-/AA}$ -Zelllinien unter genotoxischer Behandlung bestätigt werden. Verglichen mit den $p53^{+/+}$ -Zellen, die als WT-Kontrolle dienten, war die *phospho-deficient* Mutante ($p53^{-/AA}$) hinsichtlich der Apoptoserate ebenso überlegen.

Um die $p53$ -vermittelten, apoptotischen Funktionen der *phospho-deficient* $p53^{-/AA}$ -Zelllinien möglichst physiologisch zu untersuchen, wurden HCT116-Zellen generiert, bei denen die gewünschten Mutationen mittels CRISPR/Cas9 in den endogenen $p53$ -Locus eingebracht

wurden (siehe Abschnitt 5.2). Somit konnte eine vergleichbare p53-Expression in allen verwendeten Zelllinien gewährleistet werden, die durch eine natürliche p53-Induktion hochreguliert wird. Die eingebrachte Mutation wurde mittels Sequenzierung isolierter cDNA bestätigt (siehe Abb. 12). Nachdem sich die p53-Phospho-Mutanten (p53^{-AA}, p53^{-DD}) anfänglich als polyklonal herausstellten, konnten nach einer erneuten Adeno-Cre-Infektion mit anschließender Einzelzellamplifikation die gewünschten monoklonalen p53^{-AA}- und p53^{-DD}-Zelllinien generiert werden. Die normale Lokalisation im Zellkern und die Stabilisierung des Proteins durch den Mdm2-Inhibitor Nutlin wurde ebenfalls bestätigt (siehe Abb. 19). Die p53^{-AA}- und p53^{-DD}-Zelllinien wiesen ebenso wie die WT-Kontrollen eine kaum detektierbare, basale p53-Expression sowie eine vergleichbare Induktion durch Nutlin auf. Damit lassen sich die Ergebnisse zuverlässig vergleichen, da sie nicht auf einer unterschiedlichen Ausprägung der p53-Expression beruhen. Zur Aktivierung der p53-Expression wurde der DNA-Interkalator Doxorubicin verwendet, der Doppelstrangbrüche erzeugt und somit durch ATM und Chk2 eine Protein-stabilisierende Phosphorylierung von p53 induziert (Kaeser et al., 2004). Die optimale Dosis von 25 µg/mL über einen Zeitraum von etwa 16 bis 24 Stunden wurde in einer Reihe von Experimenten zuvor ermittelt (Daten nicht abgebildet). So zeigen die p53^{-AA}-Zelllinien als Reaktion auf genotoxischen Stress durch Doxorubicin ein deutlich höheres Proteinlevel der p53-Markerproteine für Apoptose (cPARP) und für Seneszenz (p21). Darüber hinaus konnte durchflusszytometrisch mittels Annexin-V-Färbung bestätigt werden, dass die *phospho-deficient* Mutanten (p53^{-AA}-Zelllinie) zu einer deutlich höheren Apoptoserate als die *phospho-mimic* Mutanten (p53^{-DD}-Zelllinie) und die p53^{-/+}-Zellen führen. Demnach resultiert der Verlust der Phosphorylierung von Ser183 und Ser185 mit einer verstärkten p53-Zielgen-Expression mit der Folge einer erhöhten oder beschleunigten Apoptoserate. Auch in der Zeitverlauf-Analyse im *Live-Cell-Imaging* wurde der beschleunigte Untergang der p53^{-AA}-Zelllinien gegenüber den p53^{-DD}- Zelllinien sowie den p53^{-/+}-Zellen gezeigt. Da der Abfall der Zellkonfluenz bei allen Genotypen zunächst etwa zeitgleich nach 48 Stunden begann, bestätigt sich somit die erhöhte Apoptoserate der *phospho-deficient* exprimierenden p53^{-AA}-Zelllinie gegenüber den anderen untersuchten Genotypen. Interessanterweise zeigen die *phospho-mimic* exprimierenden p53^{-DD}-Zelllinien unter Doxorubicin-Behandlung in der Induktion der p53-Zielgene sowie der Apoptoserate ein vergleichbares Niveau zu den p53^{-/+}-Zellen. Somit wäre es denkbar, dass die beiden Serin-Moleküle an den Positionen 183 und 185 in p53^{-/+}-Zellen überwiegend im phosphorylierten Zustand vorliegen.

8.2 Bedeutung und Relevanz der Ergebnisse

8.2.1 Die fehlende Phosphorylierung der p53^{SA}-Maus hat keine Relevanz bei der 3-MC induzierten Kanzerogenese

Die ausgebliebenen Unterschiede in der tumorsuppressiven Aktivität zwischen p53^{SA}- und p53^{WT}-Mäusen bei der chemischen Kanzerogenese im Gegensatz zum CRISPR-induzierten Lungentumormodell können verschiedene Ursachen haben. So haben bereits *Halevy et al.* gezeigt, dass bei chemisch induzierten Fibrosarkomen eine besonders hohe Rate an p53-Mutationen auftritt (Halevy et al., 1991). Dabei handelt es sich in der überwiegenden Anzahl um C-zu-A- und G-zu-T-Transversionen. Der Austausch einer Purinbase durch eine Pyrimidinbase oder umgekehrt führt zu einer deutlich stärker ausgeprägten Mutationslast als eine Transition (C.-L. Lee et al., 2019). Möglicherweise ist daher der Einfluss der *phospho-deficient* p53-Mutante auf die tumorsuppressive Aktivität im gewählten Tumormodell verhältnismäßig gering, sodass die hohe Mutationslast bei der Injektion von 3-MC den Effekt der Phosphorylierung von Ser180 überschattet. Eine potenzielle Erklärung dafür zielt darauf ab, dass über 60 der insgesamt 393 Aminosäuren des humanen p53 posttranslational modifiziert werden können. Diese Aminosäuren machen bis auf sechs ausgewählte Aminosäuren (Lys132, Thr155, Ser215, Glu258, Asp259 und Cys277) nur einen kleinen Bruchteil aller p53-Mutationen aus (Nguyen et al., 2014). Daher es ist möglich, dass diese Aminosäuren, zu denen auch das humane Ser183 (entspricht murinem Ser180) gehört, für die Tumorentstehung nur eine geringe Bedeutung haben.

Weiterhin wurden neben häufigen p53-Mutationen in 3-MC induzierten Fibrosarkomen bei Mäusen (über 70% der untersuchten Tumoren) eine gehäufte *c-Myc* Amplifikation und *K-Ras* Mutation (jeweils knapp 30% der untersuchten Tumoren) beschrieben. Diese p53-Mutationen befanden sich in den Exons 5 bis 8, sodass davon auch die H1-Helix mit dem benachbarten Ser180 betroffen ist (Watanabe et al., 1999). Diese Mutationen liegen somit vor allem in dem sensiblen Bereich von *TP53*, dessen Codons nach der Translation für die DNA-Bindungs-Kooperativität verantwortlich sind. Demnach liegt es nahe, dass die *phospho-deficient* p53-Mutante ihren tumorsuppressiven Effekt bezüglich der Genese von Fibrosarkomen aufgrund von Mutationen gar nicht erst voll entfalten kann. Weiterhin zeigen die Ergebnisse von *Watanabe et al.*, dass mit *c-Myc* und *K-Ras* weitere Gene mit einem ausgeprägten kanzerogenen Potenzial Einfluss auf die Entstehung von Fibrosarkomen haben und somit den tumorsuppressiven Effekt von p53 überschatten können (Oster et al., 2002; Prior et al., 2020). Neben den zuvor genannten Mechanismen wird weiterhin eine verstärkte *Mdm2*-Amplifikation

in Weichteilsarkomen beschrieben, die die Gruppe der Fibrosarkome umfasst (Coindre, 2010; Rieske et al., 1999; Szadowska et al., 1999). Diese führen, genau wie *TP53*-Mutationen, zur Inaktivierung von p53. So sind *MDM2*-Amplifikationen und *TP53*-Mutationen in 66% der menschlichen Sarkome vorhanden, was auf einen relevanten Effekt der p53-Inaktivierung zur Entstehung von Fibrosarkomen schließen lässt (Cerami et al., 2012; Gao et al., 2013). Wenn es also eine inhibitorische Phosphorylierung an Ser180 in den betroffenen Bindegewebszellen gäbe, sollte sich dies in einer reduzierten Tumorinzidenz bei der p53^{SA}-Maus widerspiegeln. Demnach deuten die beschriebenen Ergebnisse darauf hin, dass diese Phosphorylierung in den entsprechenden Zellen nicht vorhanden ist, oder seine Wirkung nicht entfalten kann, weil p53 aufgrund der häufigen *MDM2*-Amplifikationen zu schnell abgebaut wird.

8.2.2 Die p53^{SA}-Maus entfaltet ihre tumorsuppressive Aktivität vor allem in frühen Tumorstadien

Bei der immunhistochemischen Färbung der Lungenpräparate auf den *Eml4-Alk*-Aktivitätsmarker p-ERK zeigte sich eine vergleichbare Aktivität bei den beiden Genotypen. *Alk* ist im physiologischen Zustand vor allem in die neuronale Entwicklung involviert und wird nicht endogen im adulten Lungengewebe exprimiert (Janoueix-Lerosey et al., 2018). Durch die Fusion mit *Eml4* entsteht das Fusionsgen *Eml4-Alk* unter der Kontrolle des *Eml4*-Promotors, der eine ektope Expression induziert (Ducray et al., 2019). Zum Nachweis der Aktivität des *Eml4-Alk*-Fusionsproteins bot sich daher eine immunhistochemische Färbung gegen verschiedene Proteine der Downstream-Signalkaskade an. In der Literaturrecherche hat sich dabei p-ERK als zuverlässiges Markerprotein herausgestellt (Ma et al., 2019; Takezawa et al., 2011; Tanizaki et al., 2012). Mittels Quantifizierung der p-ERK-Färbung wurde deutlich, dass die adenovirale Infektion bei beiden Genotypen eine vergleichbare *Eml4-Alk*-Aktivität induziert hat, sodass der Genotyp S180A im untersuchten, meist fortgeschrittenen Tumorstadium vermutlich keinen relevanten Einfluss mehr auf diese hat. Daher ist der ausgeprägte tumorsuppressive Effekt der p53^{SA}-Maus nicht auf Unterschiede in dem Ausmaß der Expression des Fusionsonkogens, sondern eher auf die *phospho-deficient* p53-Mutation zurückzuführen. Kongruent zu den Daten von *Feldser et al.* war in *Kras*-induzierten murinen Adenokarzinomen der Lunge das p-Erk-Niveau gegenüber dem Phosphorylierungs-Level in Adenomen drastisch erhöht (Feldser et al., 2010). Im Vergleich mit *Maddalo et al.* ist das p-ERK-Proteinlevel allerdings verhältnismäßig gering, was vermutlich mit der verwendeten Methodik der Quantifizierung zu begründen ist. So wurde in der vorliegenden Arbeit das Verhältnis von p-ERK-positiven Zellen zum gesamten Gewebe berechnet, während bei

Maddalo et al. das Verhältnis nur in Bezug auf die Tumoren selbst angegeben wird (*Maddalo et al.*, 2014). Möglicherweise ist eine Ergänzung der immunhistochemischen Analyse durch weitere Proteine sinnvoll, die typischerweise in der von Eml4-Alk ausgelösten Signalkaskade vermehrt exprimiert werden. So kann das Eml4-Alk-Aktivitätsniveau durch weitere Proteine wie STAT3 quantifiziert werden, welches in verschiedenen Studien neben p-ERK ebenfalls als Markerprotein beschrieben wird (*Ma et al.*, 2019; *Takezawa et al.*, 2011; *Tanizaki et al.*, 2012). Das durch eine erhöhte Eml4-Alk-Aktivität verstärkt exprimierte *downstream*-Protein STAT3 ist außerdem ein Gegenspieler von p53, indem es an den Promotor von *TP53* bindet und die *TP53*-vermittelte Genexpression direkt inhibiert (*Niu et al.*, 2005). Gleichzeitig fungiert STAT3 als proliferationsfördernder Transkriptionsfaktor, indem es diverse Zielgene aktiviert, die in Prozesse wie Metastasierung und Zellüberleben involviert sind (*Devarajan & Huang*, 2009). So liegt es nahe, dass die dargestellten Ergebnisse unter anderem durch die antagonistische Wirkung von p53 und STAT3 zu erklären sind. Bei manchen Lungenepithelzellen wird möglicherweise ein besonders effizientes CRISPR-induziertes Rearrangement in einer enorm hohen Eml4-Alk-Aktivität resultiert sein. Innerhalb dieser Zellen kann daher der Effekt des proliferationsfördernden und *TP53*-hemmenden STAT3 die tumorsuppressive Aktivität von p53 überstiegen haben. In diesen Fällen einer ausgeprägten Eml4-Alk-Aktivität hat scheinbar selbst die *phospho-deficient* p53-Mutante keinen relevanten Effekt mehr oder kann seinen tumorsuppressiven Charakter nicht mehr voll entfalten, sodass die beschriebenen pulmonalen Adenokarzinome mit einer vergleichbaren p-ERK-Aktivität in beiden Genotypen resultiert sind.

Auf der anderen Seite gibt es auch *downstream*-Proteine wie MAPK und PI3K in der von Eml4-Alk ausgelösten Signalkaskade, die p53 phosphorylieren und damit aktivieren sowie die Translation von p53 verstärken (*Abraham & O'Neill*, 2014; *G. S. Wu*, 2004). So könnte in manchen Zellen eine Eml4-Alk-vermittelte verstärkte p53-Aktivierung den Übergang von Adenomen zu Adenokarzinomen verhindert haben. Warum genau teilweise der p53-aktivierende und teilweise der p53-inhibierende Signalweg einen größeren Effekt hat, ist dabei noch unklar. *Sabir et al.* konnten diesbezüglich zeigen, dass die Aktivität des Eml4-Alk-Fusionsproteins von weiteren zellulären Einflüssen abhängig ist (*Sabir et al.*, 2017). Möglicherweise spielen daher verschiedene Ko-Mutationen eine entscheidende Rolle, welcher Weg der Eml4-Alk-Signalkaskade die Überhand gewinnt.

Weiterhin ist beispielsweise aus der Erforschung kolorektaler Karzinome bekannt, dass eine *TP53*-Mutation im Sinne der Adenom-Karzinom-Sequenz entscheidend für den Übergang von prä-malignen Adenomen zu Karzinomen ist (*Leslie et al.*, 2002). Dies ist darüber hinaus mit

einer schlechten Prognose sowie einer erhöhten Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Behandlungsansätzen vergesellschaftet (H. Li et al., 2019). Da in diesem Zusammenhang *Leslie et al.* bereits zeigen konnten, dass dafür verschiedene prä-Mutationen von *APC* und *K-Ras* notwendig sind, ist dieser Aspekt möglicherweise auch im zugrundeliegenden Experiment zu berücksichtigen (Leslie et al., 2002). So ist der *TP53*-Mutationsstatus nicht als alleinstehendes Ereignis zu betrachten, sondern hängt unter anderem vom Mutationsstatus weiterer Protoonko- und Tumorsuppressorgene ab. Daher ist die verringerte Tumorzinzidenz bei der $p53^{SA}$ -Maus gegenüber der $p53^{WT}$ -Maus vermutlich auch von anderen Zellzyklus-beeinflussenden Genen abhängig, deren Expression durch das onkogene Fusionsprotein Eml4-Alk beeinflusst wird. Schließlich konnten zwei Effekte beobachtet werden: Zum einen war die Aktivität von p-ERK, und damit indirekt von Eml4-Alk, zwischen den Adenomen und zwischen den Adenokarzinomen der $p53^{SA}$ -Maus und der $p53^{WT}$ -Maus vergleichbar. Zum anderen war die Tumorzinzidenz bei der $p53^{SA}$ -Maus deutlich geringer gegenüber der $p53^{WT}$ -Maus. Demnach hat die Phosphorylierung von Ser180 eventuell keinen relevanten Einfluss auf die Aktivität von Eml4-Alk oder dessen *downstream*-Proteine, sondern steuert seine nachgewiesene tumorprotektive Wirkung über andere Mechanismen.

8.2.3 Die p53-vermittelten Einflüsse auf Tumorigenese und Tumorsuppression sind abhängig vom Tumorstadium

Die Quantifizierung des Proliferationsmarkers Ki-67 nach immunhistochemischer Färbung hat keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen gezeigt.

Das Protein Ki-67 wird seit über 30 Jahren als Proliferationsmarker verwendet, da es in proliferierenden Zellen über alle Phasen des aktiven Zellzyklus stark exprimiert wird (Sun & Kaufman, 2018). Es korreliert streng mit dem Ausmaß der Zellproliferation und ist in der G_0 -Phase hingegen nicht mehr nachweisbar, sodass es einen exzellenten Marker für Tumorzellen in der Immunhistochemie darstellt (Scholzen & Gerdes, 2000). Analog zu den p-ERK-Ergebnissen ergab die Quantifizierung der Ki-67-Färbung auch bei den Adenomen eine geringere Intensität im Vergleich zu den Adenokarzinomen, die eine deutlich höhere Proliferationsrate aufweisen (Garnett et al., 2017). Die Lungenpräparate beider Genotypen zeigten vergleichbare Ki-67-Level, sodass von einer ähnlichen Proliferationsrate ausgegangen werden kann. Es wäre daher denkbar, dass der Verlust der p53-Phosphorylierung an Ser180 besonders zu einer tumorsuppressiven Aktivität in frühen Tumorstadien führt. So scheint dieser Genotyp keinen Einfluss mehr auf fortgeschrittene Adenokarzinome zu haben, wenn *TP53* ohnehin mutiert ist und seine Wirkung als Tumorsuppressor nicht mehr entfalten kann.

Vergleichbare Zusammenhänge von unterschiedlichen p53-vermittelten tumorsuppressiven Einflüssen in Abhängigkeit vom Tumorstadium wurden auch in Reaktivierungs-Versuchen gezeigt. Der Effekt einer Reaktivierung der p53-Funktion in Form einer Tumorregression wurde dabei bereits vielfach nachgewiesen (Selivanova & Wiman, 2007; Ventura et al., 2007; W. Wang & El-Deiry, 2008). Mit besonderer Relevanz bezüglich der vorliegenden Arbeit wurde von *Feldser et al.* der Effekt einer p53-Reaktivierung im Vergleich zwischen frühen und späten pulmonalen Tumorstadien bei *Trp53^{LSL/LSL}; Kras^{LA2/+}; Rosa26^{CreERT2}* Mäusen, repräsentiert durch Adenome und Adenokarzinome, untersucht. Dabei zeigte sich, dass explizit die Adenome nicht von einer p53-Reaktivierung profitieren. Im Gegensatz dazu konnte eine verstärkte *Trp53*- und *p21*-Expression mit dem Effekt einer reduzierten Zellproliferation in den Adenokarzinomen beobachtet werden. Weiterhin gab es eine signifikante Überschneidung des Genexpressionsprofils von Adenomen mit Tumoren, in denen eine p53-Reaktivierung stattgefunden hat (Feldser et al., 2010). Diese Daten zeigen, dass die Reaktivierung von Wildtyp-*TP53* insbesondere in fortgeschrittenen Tumorstadien die Zellproliferation bremsen und die Tumorzellen hinsichtlich ihres Genexpressionsprofils in ein prä-malignes Stadium überführen kann.

Diese Ergebnisse unterstreichen die unterschiedlichen Effekte von p53 in Abhängigkeit vom Stadium des Tumors. Somit ist es entweder beim Übergang der Adenome hin zu Adenokarzinomen zur Mutation von *TP53* bei der p53^{SA}-Maus gekommen oder die *phospho-deficient* p53-Mutante und Wildtyp-p53 sind in fortgeschrittenen Tumorstadien ebenbürtig. Daraus lässt sich schließen, dass eine mögliche onkologische Therapie durch die Inhibition der Phosphorylierung der Serinreste nahe der H1-Helix mit dem Ziel der Tumorsuppression nur unter bestimmten Umständen sinnvoll wäre. Da der tumorsuppressive Effekt der *phospho-deficient* p53-Mutante in fortgeschrittenen Tumorstadien nicht mehr nachweisbar ist, würde eine therapeutische Inhibition der Phosphorylierung dort vermutlich keinen Nutzen mehr bringen.

8.2.4 Die tumorsuppressive Aktivität der p53^{SA}-Maus ist modellabhängig

Die *in-vivo* Untersuchungen zur Tumorsuszeptibilität der p53^{SA}-Mäuse ergaben unterschiedliche Antworten auf die induzierte Kanzerogenese. Bei der chemischen Kanzerogenese mit dem DNA-Adduktor 3-Methylcholanthren konnten weder Unterschiede im tumorfreien Überleben noch im Gesamtüberleben festgestellt werden. Bei den CRISPR-induzierten *Eml4-Alk*-Fusionsonkogen-vermittelten Lungentumoren hingegen gab es Unterschiede in Form einer signifikant erhöhten tumorsuppressiven Aktivität. Dabei wurden

jeweils Tumormodelle mit soliden Tumoren gewählt, da diese den größten Anteil an allen humanen Tumoren ausmachen (Koch-Institut & Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V., 2019). Es ist daher denkbar, dass das zugrundeliegende Tumormodell der chemisch-induzierten Fibrosarkome nicht geeignet ist, um die p53-vermittelte Tumorsuppression in Abhängigkeit von der Phosphorylierung der H1-Helix zu untersuchen. So haben auch *Feldser et al.* vermutet, dass nur bestimmte Tumorentitäten sensibel gegenüber einer p53-Reaktivierung sind und so durch die Aktivierung der p53-Zielgene in eine Remission gebracht werden können (Feldser et al., 2010).

Weiterhin ergab die Analyse der CRISPR-induzierten *Eml4-Alk*-positiven Lungentumoren, dass die *phospho-deficient* p53-Mutante eventuell nur in frühen Stadien der Tumorigenese seine stärker ausgeprägte tumorsuppressive Funktion entfalten kann. Demnach wäre es möglich, dass durch die punktuelle Injektion von 3-MC eine lokale, besonders hohe Konzentration des enorm DNA-schädlichen Karzinogens zu einem beschleunigten und aggressiveren Tumorwachstum geführt hat. In diesem Fall hätten die empfindlichen frühen Tumorstadien für eine nicht ausreichend lange Zeit vorgelegen. Darüber hinaus hat das Tumormodell der CRISPR-induzierten *Eml4-Alk*-positiven Lungentumoren eine höhere klinische Relevanz, da die Tumorigenese authentischer als bei der chemischen Kanzerogenese nachgestellt wird. Anstelle der lokalen Injektion von 3-MC werden durch die adenovirale Infektion einzelne Lungenepithelzellen infiziert und führen im Zeitverlauf durch die Onkogen-Expression zu einer Transformation, die der Tumorentstehung im Menschen am ehesten ähnelt. Außerdem führen Lungentumoren die weltweite Mortalität unter den Krebserkrankungen an (Mao et al., 2016), sodass ein tumorsuppressiver Effekt der *phospho-deficient* p53-Mutante auf diese Tumorentität eine größere klinische Bedeutung hat als der Einfluss auf die Entstehung und das Wachstum von Fibrosarkomen.

8.2.5 Die erhöhte Apoptoserate der *phospho-deficient* p53-Mutante lässt sich nicht auf *PUMA* oder *NOXA* zurückführen

Die Ursache der *in-vitro* erhöhten Apoptoserate der p53^{-AA}-Zelllinien gegenüber den *phospho-mimic* exprimierenden p53^{-DD}-Zelllinien sowie auch gegenüber den p53⁻⁺-Zellen sollte auf molekularbiologischer Ebene untersucht werden. In einer q-RT-PCR-Analyse wurde daher die Expression von *PUMA*, einem elementaren p53-abhängigen Apoptose-Effektor (Hemann et al., 2004), sowie von *NOXA*, das ebenfalls ein wichtiger Induktor der p53-vermittelten Apoptose ist (E. Oda, 2000), genauer analysiert. Hier zeigte sich eine signifikant erhöhte Induktion von *PUMA* durch die *phospho-deficient* p53-Mutante im Vergleich zur *phospho-mimic* p53-

Mutante, während eine vergleichbare Induktion von *PUMA* bei den p53^{-AA}-Zelllinien und den p53^{-/+}-Zellen messbar war. In Bezug auf *NOXA* konnten bei den getesteten Genotypen keine Unterschiede in der Induktions-Effizienz festgestellt werden.

Für die ausbleibenden Unterschiede in der p53-vermittelten pro-apoptotischen Genexpression von *PUMA* und *NOXA* kann es verschiedene Ursachen geben. So sind besonders schwere DNA-Schäden notwendig, damit p53 die Expression pro-apoptotischer Gene induziert (Gomez-Lazaro et al., 2004). In diesem Zusammenhang haben *Lin et al.* auch gezeigt, dass für die p53-vermittelte Apoptose-Induktion durch Doxorubicin in p53^{WT}-Zellen Konzentrationen von etwa 1 µM notwendig sind (Lin et al., 2018). In der vorliegenden Arbeit betrug die verwendete Konzentration umgerechnet circa 0,1 µM Doxorubicin. Demnach könnten auch Mechanismen der p53-unabhängigen Apoptose zugrunde liegen, wie beispielsweise durch den Einfluss von Fluoxetin auf Kolonkarzinomzellen gezeigt wurde (Marcinkute et al., 2019). Die vorliegenden Daten aus den anderen *in-vitro*- sowie den *in-vivo*-Experimenten sprechen allerdings für eine entscheidende Rolle des Phosphorylierungsstatus der H1-Helix von p53. Dies wird dadurch deutlich, dass allein die fehlende Phosphorylierung der *phospho-deficient* p53-Mutante eine signifikant erhöhte Apoptoserate gegenüber den p53^{-/+}-Zellen induziert. Daneben ist auch eine Transkriptions-unabhängige p53-vermittelte Apoptose möglich. So kann p53 neben seiner Hauptfunktion als Transkriptionsfaktor auch unabhängig von Transkription Apoptose einleiten, indem es Mitglieder der Bcl2-Familie wie Bax oder Bak direkt aktiviert (Moll et al., 2005). Dadurch kommt es zur MOMP und somit zur Einleitung des intrinsischen Apoptoseweges, wobei PUMA die direkte Aktivierung von Bax durch p53 ermöglicht (Chipuk, 2005). Darüber hinaus haben *Ho et al.* gezeigt, dass insbesondere Doxorubicin in der Lage ist, diese Transkriptions-unabhängige p53-vermittelte Apoptose zu induzieren (Ho et al., 2019).

Zusammenfassend lassen sich anhand der durchgeführten Genexpressionsanalyse keine eindeutigen Mechanismen für die erhöhte Apoptoserate, die im Abschnitt 7.1.5 beschrieben wird, ableiten. Es ist weiterhin bekannt, dass an der p53-vermittelten Apoptose eine Bandbreite an verschiedenen Genen beteiligt ist, deren Zusammenspiel in Summe das Ausmaß an Apoptose bestimmen (Timofeev et al., 2020). Bezüglich einer stärker ausgeprägten Transkriptions-unabhängigen Apoptose ist anzumerken, dass durch die fehlende Phosphorylierung der *phospho-deficient* p53-Mutante eigentlich eine erhöhte DNA-Bindungs-Kooperativität mit einer verstärkten Transkription pro-apoptotischer Gene einhergehen sollte. Schließlich sind neben *PUMA* und *NOXA* noch andere, nicht untersuchte Mechanismen wie die Transkriptions-unabhängige p53-vermittelte Apoptose und weitere pro-apoptotische p53-Zielgene essenziell für die Induktion der Apoptose.

8.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die fehlende Phosphorylierung von Ser183 und Ser185 in humanen Zellen, bzw. von Ser180 im murinen Genom, gegenüber p53^{WT} einen tumorsuppressiven Effekt im Sinne einer erhöhten Apoptoserate hat. Es bleibt jedoch weiterhin unklar, ob diese Modifikation *in-vivo* aktiv reguliert wird und wenn ja, wie dies genau geschieht. *Timofeev et al.* konnten bereits zeigen, dass die *phospho-deficient* Variante der Serinmoleküle zu einer erhöhten DNA-Bindungs-Kooperativität führt (Timofeev et al., 2020), während dies wiederum nachweislich in einer verstärkten Aktivierung pro-apoptotischer Gene resultiert (Schlereth et al., 2010). Ebenso wurde die Aurora Kinase B als verantwortliches Enzym zur Phosphorylierung von Ser183 in humanen Zellen beschrieben (L. Wu et al., 2011). Demnach könnten weitere Studien in Zukunft die genaue Interaktion der H1-Helix und der Aurora Kinase B untersuchen, um potenzielle Kinase-Inhibitoren zur therapeutischen Steuerung des Phosphorylierungsstatus zu entwickeln. Allerdings können *phospho-mimic* und *phospho-deficient* Modifikationen in p53 auch zum Verlust von spezifischen Phosphorylierungen führen (Nguyen et al., 2014). Da also die aktive Phosphorylierung oder Dephosphorylierung auch einen Einfluss auf PTMs an anderen Stellen im gleichen Protein haben kann, muss dieser Effekt bei der vorliegenden *phospho-deficient* p53-Mutante ebenfalls untersucht werden. Schließlich sind auch PTMs, wie zum Beispiel eine Lys120-Acetylierung oder eine Ser18-Phosphorylierung, beschrieben, die ebenso wie die erhöhte DNA-Bindungs-Kooperativität zu einer erhöhten Apoptoserate führen können (Sluss et al., 2010; Tang et al., 2006). Dies würde den gewünschten Effekt der *phospho-deficient* p53-Mutante unterstreichen. Umgekehrt können auch unerwünschte PTMs an anderen Stellen auftreten, die wiederum die tumorsuppressive Aktivität von p53 beeinträchtigen könnten. Letztlich hat die vorliegende Arbeit auch *in-vivo* gezeigt, dass p53^{SA}-Mäuse vor allem in frühen Tumorstadien eine ausgeprägte tumorsuppressive Wirkung besitzen und der p53^{WT}-Maus überlegen sind.

Zusammenfassend stellen die Serinmoleküle in der direkten Nachbarschaft der H1-Helix einen interessanten Ansatzpunkt für zukünftige onkologische Therapien dar. So könnte die Entwicklung von Medikamenten zur gezielten Inhibition der Serin-Phosphorylierung eine therapeutisch steuerbare Erhöhung der Apoptoserate ermöglichen. Dieser Effekt könnte insbesondere in frühen Tumorstadien zu einer verbesserten tumorsuppressiven Wirkung beitragen. In Kombination mit der Chemo- und Strahlentherapie gäbe es somit weitere Möglichkeiten zur Bekämpfung von Krebserkrankungen.

Literaturverzeichnis

- Abraham, A. G., & O'Neill, E. (2014). PI3K/Akt-mediated regulation of p53 in cancer. *Biochemical Society Transactions*, 42(4), 798–803. <https://doi.org/10.1042/BST20140070>
- Aisner, D. L., Sholl, L. M., Berry, L. D., Rossi, M. R., Chen, H., Fujimoto, J., Moreira, A. L., Ramalingam, S. S., Villaruz, L. C., Otterson, G. A., Haura, E., Politi, K., Glisson, B., Cetnar, J., Garon, E. B., Schiller, J., Waqar, S. N., Sequist, L. V., Brahmer, J., ... Kwiatkowski, D. J. (2018). The Impact of Smoking and TP53 Mutations in Lung Adenocarcinoma Patients with Targetable Mutations—The Lung Cancer Mutation Consortium (LCMC2). *Clinical Cancer Research*, 24(5), 1038–1047. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2289>
- Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Grosse, F., Kim, E., Wiesmüller, L., & Deppert, W. (1999). Maintenance of genomic integrity by p53: Complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene*, 18(53), 7706–7717. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202952>
- Aylon, Y., & Oren, M. (2016). The Paradox of p53: What, How, and Why? *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(10), a026328. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026328>
- Baba, S., Cho, S. Y., Ye, Z., Cheng, L., Engles, J. M., & Wahl, R. L. (2007). How reproducible is bioluminescent imaging of tumor cell growth? Single time point versus the dynamic measurement approach. *Molecular Imaging*, 6(5), 315–322.
- Baklaushev, V. P., Kilpeläinen, A., Petkov, S., Abakumov, M. A., Grinenko, N. F., Yusubaliev, G. M., Latanova, A. A., Gubskiy, I. L., Zabozaev, F. G., Starodubova, E. S., Abakumova, T. O., Isagulians, M. G., & Chekhonin, V. P. (2017). Luciferase Expression Allows Bioluminescence Imaging But Imposes Limitations on the Orthotopic Mouse (4T1) Model of Breast Cancer. *Scientific Reports*, 7(1), 7715. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07851-z>
- Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., & Oren, M. (1993). Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *The EMBO Journal*, 12(2), 461–468.
- Barrett, J. C. (1993). Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 100, 9–20. <https://doi.org/10.1289/ehp.931009>
- Beausejour, C. M. (2003). Reversal of human cellular senescence: Roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO Journal*, 22(16), 4212–4222. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg417>
- Beckerman, R., & Prives, C. (2010). Transcriptional Regulation by P53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(8), a000935–a000935. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000935>
- Bell, J. C. (1988). Oncogenes. *Cancer Letters*, 40(1), 1–5. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(88\)90255-8](https://doi.org/10.1016/0304-3835(88)90255-8)
- Beno, I., Rosenthal, K., Levitine, M., Shaulov, L., & Haran, T. E. (2011). Sequence-dependent cooperative binding of p53 to DNA targets and its relationship to the structural properties of the DNA targets. *Nucleic Acids Research*, 39(5), 1919–1932. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1044>
- Brady, C. A., & Attardi, L. D. (2010). P53 at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(15), 2527–2532. <https://doi.org/10.1242/jcs.064501>
- Brooks, C. L., & Gu, W. (2011). P53 regulation by ubiquitin. *FEBS Letters*, 585(18), 2803–2809. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.022>
- Cann, K. L., & Hicks, G. G. (2007). Regulation of the cellular DNA double-strand break response. *Biochemistry and Cell Biology*, 85(6), 663–674. <https://doi.org/10.1139/O07-135>
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A.,

- Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., & Schultz, N. (2012). The cBio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discovery*, *2*(5), 401–404. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>
- Chan, W. M., Siu, W. Y., Lau, A., & Poon, R. Y. C. (2004). How Many Mutant p53 Molecules Are Needed To Inactivate a Tetramer? *Molecular and Cellular Biology*, *24*(8), 3536–3551. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.8.3536-3551.2004>
- Chen, J. (2016). The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *6*(3), a026104. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026104>
- Cheon, D.-J., & Orsulic, S. (2011). Mouse Models of Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *6*(1), 95–119. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.3.121806.154244>
- Chipuk, J. E. (2005). PUMA Couples the Nuclear and Cytoplasmic Proapoptotic Function of p53. *Science*, *309*(5741), 1732–1735. <https://doi.org/10.1126/science.1114297>
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P., & Pavletich, N. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: Understanding tumorigenic mutations. *Science*, *265*(5170), 346–355. <https://doi.org/10.1126/science.8023157>
- Clair, S. St., Giono, L., Varmeh-Ziaie, S., Resnick-Silverman, L., Liu, W., Padi, A., Dastidar, J., DaCosta, A., Mattia, M., & Manfredi, J. J. (2004). DNA Damage-Induced Downregulation of Cdc25C Is Mediated by p53 via Two Independent Mechanisms. *Molecular Cell*, *16*(5), 725–736. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.002>
- Clore, G., Omichinski, J., Sakaguchi, K., Zambrano, N., Sakamoto, H., Appella, E., & Gronenborn, A. (1994). High-resolution structure of the oligomerization domain of p53 by multidimensional NMR. *Science*, *265*(5170), 386–391. <https://doi.org/10.1126/science.8023159>
- Coindre, J.-M. (2010). [Molecular biology of soft-tissue sarcomas]. *Bulletin Du Cancer*, *97*(11), 1337–1345. <https://doi.org/10.1684/bdc.2010.1213>
- Collado, M., Blasco, M. A., & Serrano, M. (2007). Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell*, *130*(2), 223–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.003>
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., Benguría, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., Beach, D., & Serrano, M. (2005). Senescence in premalignant tumours. *Nature*, *436*(7051), 642–642. <https://doi.org/10.1038/436642a>
- Craig, Chandler, Gellert, Lambowitz, Rice, & Sandmeyer (Hrsg.). (2015). Cre Recombinase. In *Mobile DNA III* (S. 119–138). American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0014-2014>
- D’Arcy, M. S. (2019). Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, *43*(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- DeHart, C. J., Chahal, J. S., Flint, S. J., & Perlman, D. H. (2014). Extensive Post-translational Modification of Active and Inactivated Forms of Endogenous p53. *Molecular & Cellular Proteomics*, *13*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.030254>
- DeHart, C. J., Perlman, D. H., & Flint, S. J. (2015). Impact of the Adenoviral E4 Orf3 Protein on the Activity and Posttranslational Modification of p53. *Journal of Virology*, *89*(6), 3209–3220. <https://doi.org/10.1128/JVI.03072-14>
- Dehner, A., Klein, C., Hansen, S., Müller, L., Buchner, J., Schwaiger, M., & Kessler, H. (2005). Cooperative Binding of p53 to DNA: Regulation by Protein-Protein Interactions through a Double Salt Bridge. *Angewandte Chemie International Edition*, *44*(33), 5247–5251. <https://doi.org/10.1002/anie.200501887>
- Devarajan, E., & Huang, S. (2009). STAT3 as a central regulator of tumor metastases. *Current Molecular Medicine*, *9*(5), 626–633.

- <https://doi.org/10.2174/156652409788488720>
- Dick, F. A., & Rubin, S. M. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *14*(5), 297–306. <https://doi.org/10.1038/nrm3567>
- Doetschman, T. (2009). Influence of genetic background on genetically engineered mouse phenotypes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *530*, 423–433. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-471-1_23
- Ducray, S. P., Natarajan, K., Garland, G. D., Turner, S. D., & Egger, G. (2019). The Transcriptional Roles of ALK Fusion Proteins in Tumorigenesis. *Cancers*, *11*(8), 1074. <https://doi.org/10.3390/cancers11081074>
- DuPage, M., Dooley, A. L., & Jacks, T. (2009). Conditional mouse lung cancer models using adenoviral or lentiviral delivery of Cre recombinase. *Nature Protocols*, *4*(7), 1064–1072. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.95>
- El-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genetics*, *1*(1), 45–49. <https://doi.org/10.1038/ng0492-45>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, *35*(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Feldser, D. M., Kostova, K. K., Winslow, M. M., Taylor, S. E., Cashman, C., Whittaker, C. A., Sanchez-Rivera, F. J., Resnick, R., Bronson, R., Hemann, M. T., & Jacks, T. (2010). Stage-specific sensitivity to p53 restoration during lung cancer progression. *Nature*, *468*(7323), 572–575. <https://doi.org/10.1038/nature09535>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, *144*(8), 1941–1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- Fields, S., & Jang, S. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science*, *249*(4972), 1046–1049. <https://doi.org/10.1126/science.2144363>
- Fischer, M. (2017). Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*, *36*(28), 3943–3956. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.502>
- Fischer, N. W., Prodeus, A., Malkin, D., & Gariépy, J. (2016). P53 oligomerization status modulates cell fate decisions between growth, arrest and apoptosis. *Cell Cycle*, *15*(23), 3210–3219. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1241917>
- Freed-Pastor, W. A., & Prives, C. (2012). Mutant p53: One name, many proteins. *Genes & Development*, *26*(12), 1268–1286. <https://doi.org/10.1101/gad.190678.112>
- Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C., & Schultz, N. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science Signaling*, *6*(269), p11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>
- Garbow, J. R. (2004). Detection of Primary Lung Tumors in Rodents by Magnetic Resonance Imaging. *Cancer Research*, *64*(8), 2740–2742. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3258>
- García-Cao, I., García-Cao, M., Martín-Caballero, J., Criado, L. M., Klatt, P., Flores, J. M., Weill, J.-C., Blasco, M. A., & Serrano, M. (2002). „Super p53“ mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *The EMBO Journal*, *21*(22), 6225–6235. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf595>
- Garnett, S., Dutchak, K. L., McDonough, R. V., & Dankort, D. (2017). P53 loss does not permit escape from BrafV600E-induced senescence in a mouse model of lung cancer. *Oncogene*, *36*(45), 6325–6335. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.235>
- Gomez-Lazaro, M., Fernandez-Gomez, F. J., & Jordán, J. (2004). p53: Twenty five years understanding the mechanism of genome protection. *Journal of Physiology and*

- Biochemistry*, 60(4), 287–307. <https://doi.org/10.1007/BF03167075>
- Grieger, J. C., & Samulski, R. J. (2005). Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Serotypes: Impact of Larger Genomes on Infectivity and Postentry Steps. *Journal of Virology*, 79(15), 9933–9944. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.15.9933-9944.2005>
- Gully, C. P., Velazquez-Torres, G., Shin, J.-H., Fuentes-Mattei, E., Wang, E., Carlock, C., Chen, J., Rothenberg, D., Adams, H. P., Choi, H. H., Guma, S., Phan, L., Chou, P.-C., Su, C.-H., Zhang, F., Chen, J.-S., Yang, T.-Y., Yeung, S.-C. J., & Lee, M.-H. (2012). Aurora B kinase phosphorylates and instigates degradation of p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(24), E1513–E1522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110287109>
- Halevy, O., Rodel, J., Peled, A., & Oren, M. (1991). Frequent p53 mutations in chemically induced murine fibrosarcoma. *Oncogene*, 6(9), 1593–1600.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harley, C. B., Vaziri, H., Counter, C. M., & Allsopp, R. C. (1992). The telomere hypothesis of cellular aging. *Experimental Gerontology*, 27(4), 375–382. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(92\)90068-B](https://doi.org/10.1016/0531-5565(92)90068-B)
- Harper, J. W., Elledge, S. J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L. H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., & Swindell, E. (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Molecular Biology of the Cell*, 6(4), 387–400. <https://doi.org/10.1091/mbc.6.4.387>
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- Hemann, M. T., Zilfou, J. T., Zhao, Z., Burgess, D. J., Hannon, G. J., & Lowe, S. W. (2004). Suppression of tumorigenesis by the p53 target PUMA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(25), 9333–9338. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403286101>
- Hill, M. M., Adrain, C., Duriez, P. J., Creagh, E. M., & Martin, S. J. (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO Journal*, 23(10), 2134–2145. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600210>
- Ho, C.-J., Lin, R.-W., Zhu, W.-H., Wen, T.-K., Hu, C.-J., Lee, Y.-L., Hung, T.-I., & Wang, C. (2019). Transcription-independent and -dependent p53-mediated apoptosis in response to genotoxic and non-genotoxic stress. *Cell Death Discovery*, 5(1), 131. <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0211-5>
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, 157(6), 1262–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Inoue, Y., Izawa, K., Kiryu, S., Kobayashi, S., Tojo, A., & Ohtomo, K. (2008). Bioluminescent evaluation of the therapeutic effects of total body irradiation in a murine hematological malignancy model. *Experimental Hematology*, 36(12), 1634–1641. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.08.004>
- Inoue, Y., Kiryu, S., Izawa, K., Watanabe, M., Tojo, A., & Ohtomo, K. (2009). Comparison of subcutaneous and intraperitoneal injection of d-luciferin for in vivo bioluminescence imaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 36(5), 771–779. <https://doi.org/10.1007/s00259-008-1022-8>
- Inoue, Y., Kiryu, S., Watanabe, M., Tojo, A., & Ohtomo, K. (2010). Timing of Imaging after D-Luciferin Injection Affects the Longitudinal Assessment of Tumor Growth Using In Vivo Bioluminescence Imaging. *International Journal of Biomedical Imaging*, 2010, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2010/471408>

- Inoue, Y., Sheng, F., Kiryu, S., Watanabe, M., Ratanakanit, H., Izawa, K., Tojo, A., & Ohtomo, K. (2011). Gaussia Luciferase for Bioluminescence Tumor Monitoring in Comparison with Firefly Luciferase. *Molecular Imaging*, *10*(5), 7290.2010.00057. <https://doi.org/10.2310/7290.2010.00057>
- Janoueix-Lerosey, I., Lopez-Delisle, L., Delattre, O., & Rohrer, H. (2018). The ALK receptor in sympathetic neuron development and neuroblastoma. *Cell and Tissue Research*, *372*(2), 325–337. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2784-8>
- Jeffers, J. R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., MacLean, K. H., Han, J., Chittenden, T., Ihle, J. N., McKinnon, P. J., Cleveland, J. L., & Zambetti, G. P. (2003). Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell*, *4*(4), 321–328. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00244-7](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00244-7)
- Jeon, Y. H., Choi, Y., Kang, J. H., Kim, C. W., Jeong, J. M., Lee, D. S., & Chung, J.-K. (2007). Immune response to firefly luciferase as a naked DNA. *Cancer Biology & Therapy*, *6*(5), 781–786. <https://doi.org/10.4161/cbt.6.5.4005>
- Jin, Z., & El-Deiry, W. S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy*, *4*(2), 147–171. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.2.1508>
- Joerger, A. C., & Fersht, A. R. (2010). The Tumor Suppressor p53: From Structures to Drug Discovery. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(6), a000919–a000919. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000919>
- Kabadi, A. M., Ousterout, D. G., Hilton, I. B., & Gersbach, C. A. (2014). Multiplex CRISPR/Cas9-based genome engineering from a single lentiviral vector. *Nucleic Acids Research*, *42*(19), e147–e147. <https://doi.org/10.1093/nar/gku749>
- Kaesler, M. D., Pebernard, S., & Iggo, R. D. (2004). Regulation of p53 Stability and Function in HCT116 Colon Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(9), 7598–7605. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311732200>
- Kalidasan, V., Ng, W. H., Ishola, O. A., Ravichantar, N., Tan, J. J., & Das, K. T. (2021). A guide in lentiviral vector production for hard-to-transfect cells, using cardiac-derived c-kit expressing cells as a model system. *Scientific Reports*, *11*(1), 19265. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98657-7>
- Kastenhuber, E. R., & Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell*, *170*(6), 1062–1078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>
- Khanna, K. K., Keating, K. E., Kozlov, S., Scott, S., Gatei, M., Hobson, K., Taya, Y., Gabrielli, B., Chan, D., Lees-Miller, S. P., & Lavin, M. F. (1998). ATM associates with and phosphorylates p53: Mapping the region of interaction. *Nature Genetics*, *20*(4), 398–400. <https://doi.org/10.1038/3882>
- Kim, Y. Y., Jee, H. J., Um, J.-H., Kim, Y. M., Bae, S. S., & Yun, J. (2017). Cooperation between p21 and Akt is required for p53-dependent cellular senescence. *Aging Cell*, *16*(5), 1094–1103. <https://doi.org/10.1111/acel.12639>
- Kitayner, M., Rozenberg, H., Kessler, N., Rabinovich, D., Shaulov, L., Haran, T. E., & Shaked, Z. (2006). Structural Basis of DNA Recognition by p53 Tetramers. *Molecular Cell*, *22*(6), 741–753. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.015>
- Klein, C., Planker, E., Diercks, T., Kessler, H., Künkele, K.-P., Lang, K., Hansen, S., & Schwaiger, M. (2001). NMR Spectroscopy Reveals the Solution Dimerization Interface of p53 Core Domains Bound to Their Consensus DNA. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(52), 49020–49027. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107516200>
- Koch-Institut, R., & Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V. (2019). *Krebs in Deutschland 2015/2016*. Robert Koch-Institut. <https://doi.org/10.25646/5977.2>
- Koh, D. W., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2005). Mediation of cell death by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Pharmacological Research*, *52*(1), 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.02.011>

- Kracikova, M., Akiri, G., George, A., Sachidanandam, R., & Aaronson, S. A. (2013). A threshold mechanism mediates p53 cell fate decision between growth arrest and apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, *20*(4), 576–588. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.155>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, *87*(1), 99–163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>
- Kubbutat, M. H. G., Jones, S. N., & Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, *387*(6630), 299–303. <https://doi.org/10.1038/387299a0>
- Kwak, E. L., Bang, Y.-J., Camidge, D. R., Shaw, A. T., Solomon, B., Maki, R. G., Ou, S.-H. I., Dezube, B. J., Jänne, P. A., Costa, D. B., Varella-Garcia, M., Kim, W.-H., Lynch, T. J., Fidias, P., Stubbs, H., Engelman, J. A., Sequist, L. V., Tan, W., Gandhi, L., ... Iafrate, A. J. (2010). Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, *363*(18), 1693–1703. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1006448>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lane, D. P., & Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. *Nature*, *278*(5701), 261–263. <https://doi.org/10.1038/278261a0>
- Laptenko, O., Tong, D. R., Manfredi, J., & Prives, C. (2016). The Tail That Wags the Dog: How the Disordered C-Terminal Domain Controls the Transcriptional Activities of the p53 Tumor-Suppressor Protein. *Trends in Biochemical Sciences*, *41*(12), 1022–1034. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.08.011>
- Lee, C.-L., Mowery, Y. M., Daniel, A. R., Zhang, D., Sibley, A. B., Delaney, J. R., Wisdom, A. J., Qin, X., Wang, X., Caraballo, I., Gresham, J., Luo, L., Van Mater, D., Owzar, K., & Kirsch, D. G. (2019). Mutational landscape in genetically engineered, carcinogen-induced, and radiation-induced mouse sarcoma. *JCI Insight*, *4*(13), e128698. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.128698>
- Lee, W., Harvey, T. S., Yin, Y., Yau, P., Litchfield, D., & Arrowsmith, C. H. (1994). Solution structure of the tetrameric minimum transforming domain of p53. *Nature Structural & Molecular Biology*, *1*(12), 877–890. <https://doi.org/10.1038/nsb1294-877>
- Leslie, A., Carey, F. A., Pratt, N. R., & Steele, R. J. C. (2002). The colorectal adenoma–carcinoma sequence. *British Journal of Surgery*, *89*(7), 845–860. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2168.2002.02120.x>
- Li, H., Zhang, J., Tong, J. H. M., Chan, A. W. H., Yu, J., Kang, W., & To, K. F. (2019). Targeting the Oncogenic p53 Mutants in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(23), E5999. <https://doi.org/10.3390/ijms20235999>
- Li, V. D., Li, K. H., & Li, J. T. (2019). TP53 mutations as potential prognostic markers for specific cancers: Analysis of data from The Cancer Genome Atlas and the International Agency for Research on Cancer TP53 Database. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *145*(3), 625–636. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2817-z>
- Lin, R.-W., Ho, C.-J., Chen, H.-W., Pao, Y.-H., Chen, L.-E., Yang, M.-C., Huang, S.-B., Wang, S., Chen, C.-H., & Wang, C. (2018). P53 enhances apoptosis induced by doxorubicin only under conditions of severe DNA damage. *Cell Cycle*, *17*(17), 2175–2186. <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1520565>
- Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P., & Timlin, J. A. (2018). Delivering CRISPR: A review of the challenges and approaches. *Drug Delivery*, *25*(1), 1234–1257. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>
- Lipinski, C., & Hopkins, A. (2004). Navigating chemical space for biology and medicine. *Nature*, *432*(7019), 855–861. <https://doi.org/10.1038/nature03193>

- Liu, B., Chen, Y., & St Clair, D. K. (2008). ROS and p53: A versatile partnership. *Free Radical Biology & Medicine*, 44(8), 1529–1535. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.011>
- Luo, J., Su, F., Chen, D., Shiloh, A., & Gu, W. (2000). Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature*, 408(6810), 377–381. <https://doi.org/10.1038/35042612>
- Ma, L., Lv, J., Dong, Y., Zhang, X., Li, X., Zhang, H., Nong, J., Zhang, Q., Qin, N., Yang, X., Wang, J., & Zhang, S. (2019). PD-L1 Expression and Its Regulation in Lung Adenocarcinoma with ALK Translocation. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 11(2), 266–272. <https://doi.org/10.1007/s12539-019-00331-0>
- Maddalo, D., Manchado, E., Concepcion, C. P., Bonetti, C., Vidigal, J. A., Han, Y.-C., Ogrodowski, P., Crippa, A., Rekhman, N., de Stanchina, E., Lowe, S. W., & Ventura, A. (2014). In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature*, 516(7531), 423–427. <https://doi.org/10.1038/nature13902>
- Maiuri, M. C., Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Malik, S. A., & Kroemer, G. (2010). Autophagy regulation by p53. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.12.001>
- Mao, Y., Yang, D., He, J., & Krasna, M. J. (2016). Epidemiology of Lung Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 25(3), 439–445. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2016.02.001>
- Marcinkute, M., Afshinjavid, S., Fatokun, A. A., & Javid, F. A. (2019). Fluoxetine selectively induces p53-independent apoptosis in human colorectal cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 857, 172441. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172441>
- Menendez, D., Inga, A., & Resnick, M. A. (2009). The expanding universe of p53 targets. *Nature Reviews Cancer*, 9(10), 724–737. <https://doi.org/10.1038/nrc2730>
- Michalak, E. M., Villunger, A., Adams, J. M., & Strasser, A. (2008). In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute. *Cell Death & Differentiation*, 15(6), 1019–1029. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.16>
- Moll, U. M., Wolff, S., Speidel, D., & Deppert, W. (2005). Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(6), 631–636. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.09.007>
- Narita, M., Nuñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., & Lowe, S. W. (2003). Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence. *Cell*, 113(6), 703–716. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00401-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00401-X)
- Nguyen, T.-A., Menendez, D., Resnick, M. A., & Anderson, C. W. (2014). Mutant TP53 Posttranslational Modifications: Challenges and Opportunities. *Human Mutation*, 35(6), 738–755. <https://doi.org/10.1002/humu.22506>
- Niu, G., Wright, K. L., Ma, Y., Wright, G. M., Huang, M., Irby, R., Briggs, J., Karras, J., Cress, W. D., Pardoll, D., Jove, R., Chen, J., & Yu, H. (2005). Role of Stat3 in regulating p53 expression and function. *Molecular and Cellular Biology*, 25(17), 7432–7440. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.17.7432-7440.2005>
- Oda, E. (2000). Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. *Science*, 288(5468), 1053–1058. <https://doi.org/10.1126/science.288.5468.1053>
- Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y., & Taya, Y. (2000). P53AIP1, a Potential Mediator of p53-Dependent Apoptosis, and Its Regulation by Ser-46-Phosphorylated p53. *Cell*, 102(6), 849–862. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00073-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00073-8)
- Ohmura, H., & Oshimura, M. (1993). [Telomere, cellular senescence and transformation].

- Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, 51(7), 1899–1906.
- Olive, K. P., Tuveson, D. A., Ruhe, Z. C., Yin, B., Willis, N. A., Bronson, R. T., Crowley, D., & Jacks, T. (2004). Mutant p53 Gain of Function in Two Mouse Models of Li-Fraumeni Syndrome. *Cell*, 119(6), 847–860. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.004>
- Olivier, M., Eeles, R., Hollstein, M., Khan, M. A., Harris, C. C., & Hainaut, P. (2002). The IARC TP53 database: New online mutation analysis and recommendations to users. *Human Mutation*, 19(6), 607–614. <https://doi.org/10.1002/humu.10081>
- Oster, S. K., Ho, C. S. W., Soucie, E. L., & Penn, L. Z. (2002). The myc oncogene: Marvelously Complex. *Advances in Cancer Research*, 84, 81–154. [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(02\)84004-0](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(02)84004-0)
- Parikh, N., Shuck, R. L., Gagea, M., Shen, L., & Donehower, L. A. (2018). Enhanced inflammation and attenuated tumor suppressor pathways are associated with oncogene-induced lung tumors in aged mice. *Aging Cell*, 17(1), e12691. <https://doi.org/10.1111/accel.12691>
- Paroo, Z., Bollinger, R. A., Braasch, D. A., Richer, E., Corey, D. R., Antich, P. P., & Mason, R. P. (2004). Validating Bioluminescence Imaging as a High-Throughput, Quantitative Modality for Assessing Tumor Burden. *Molecular Imaging*, 3(2), 117–124. <https://doi.org/10.1162/1535350041464865>
- Pennica, D., Goeddel, D. V., Hayflick, J. S., Reich, N. C., Anderson, C. W., & Levine, A. J. (1984). The amino acid sequence of murine p53 determined from a c-DNA clone. *Virology*, 134(2), 477–482. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(84\)90316-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(84)90316-7)
- Pfeifer, A., Brandon, E. P., Kootstra, N., Gage, F. H., & Verma, I. M. (2001). Delivery of the Cre recombinase by a self-deleting lentiviral vector: Efficient gene targeting in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11450–11455. <https://doi.org/10.1073/pnas.201415498>
- Podetz-Pedersen, K. M., Vezys, V., Somia, N. V., Russell, S. J., & McIvor, R. S. (2014). Cellular Immune Response Against Firefly Luciferase After *Sleeping Beauty* –Mediated Gene Transfer *In Vivo*. *Human Gene Therapy*, 25(11), 955–965. <https://doi.org/10.1089/hum.2014.048>
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liégeois, N. J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.-W., Cordon-Cardo, C., & DePinho, R. A. (1998). The Ink4a Tumor Suppressor Gene Product, p19Arf, Interacts with MDM2 and Neutralizes MDM2's Inhibition of p53. *Cell*, 92(6), 713–723. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81400-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81400-2)
- Prior, I. A., Hood, F. E., & Hartley, J. L. (2020). The Frequency of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Research*, 80(14), 2969–2974. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-3682>
- Radaelli, E., Santagostino, S. F., Sellers, R. S., & Brayton, C. F. (2018). Immune Relevant and Immune Deficient Mice: Options and Opportunities in Translational Research. *ILAR Journal*, 59(3), 211–246. <https://doi.org/10.1093/ilar/ily026>
- Raj, N., & Attardi, L. D. (2017). The Transactivation Domains of the p53 Protein. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(1), a026047. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026047>
- Reddy, A. L., & Fialkow, P. J. (1981). Effect of solvents on methylcholanthrene-induced carcinogenesis in mice. *International Journal of Cancer*, 27(4), 501–504. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910270413>
- Rieske, P., Bartkowiak, J. K., Szadowska, A. M., Olborski, B., Harezga-Bal, B., & Debiec-Rychter, M. (1999). A comparative study of P53/MDM2 genes alterations and P53/MDM2 proteins immunoreactivity in soft-tissue sarcomas. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 18(3), 403–416.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., & Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(5), 402–412.

- <https://doi.org/10.1038/nrm2395>
- Sabir, S. R., Yeoh, S., Jackson, G., & Bayliss, R. (2017). EML4-ALK Variants: Biological and Molecular Properties, and the Implications for Patients. *Cancers*, 9(9), E118. <https://doi.org/10.3390/cancers9090118>
- Schlereth, K., Beinoraviciute-Kellner, R., Zeitlinger, M. K., Bretz, A. C., Sauer, M., Charles, J. P., Vogiatzi, F., Leich, E., Samans, B., Eilers, M., Kisker, C., Rosenwald, A., & Stiewe, T. (2010). DNA Binding Cooperativity of p53 Modulates the Decision between Cell-Cycle Arrest and Apoptosis. *Molecular Cell*, 38(3), 356–368. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.037>
- Schlereth, K., Heyl, C., Krampitz, A.-M., Mernberger, M., Finkernagel, F., Scharfe, M., Jarek, M., Leich, E., Rosenwald, A., & Stiewe, T. (2013). Characterization of the p53 Cistrome – DNA Binding Cooperativity Dissects p53’s Tumor Suppressor Functions. *PLoS Genetics*, 9(8), e1003726. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003726>
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 182(3), 311–322. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200003\)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9)
- Schuster, D. P., Kovacs, A., Garbow, J., & Piwnica-Worms, D. (2004). Recent Advances in Imaging the Lungs of Intact Small Animals. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 30(2), 129–138. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2003-0213TR>
- Selivanova, G., & Wiman, K. G. (2007). Reactivation of mutant p53: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Oncogene*, 26(15), 2243–2254. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210295>
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., & Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death & Differentiation*, 22(4), 526–539. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.216>
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2005). Senescence and immortalization: Role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*, 26(5), 867–874. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh296>
- Shi, S. R., Key, M. E., & Kalra, K. L. (1991). Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 39(6), 741–748. <https://doi.org/10.1177/39.6.1709656>
- Shieh, S.-Y., Ikeda, M., Taya, Y., & Prives, C. (1997). DNA Damage-Induced Phosphorylation of p53 Alleviates Inhibition by MDM2. *Cell*, 91(3), 325–334. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80416-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80416-X)
- Shvarts, A., Steegenga, W. T., Riteco, N., van Laar, T., Dekker, P., Bazuine, M., van Ham, R. C., van der Houven van Oordt, W., Hateboer, G., van der Eb, A. J., & Jochemsen, A. G. (1996). MDMX: A novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *The EMBO Journal*, 15(19), 5349–5357.
- Sluss, H. K., Gannon, H., Coles, A. H., Shen, Q., Eischen, C. M., & Jones, S. N. (2010). Phosphorylation of p53 Serine 18 Upregulates Apoptosis to Suppress Myc-Induced Tumorigenesis. *Molecular Cancer Research*, 8(2), 216–222. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0324>
- Soda, M., Choi, Y. L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., Bando, M., Ohno, S., Ishikawa, Y., Aburatani, H., Niki, T., Sohara, Y., Sugiyama, Y., & Mano, H. (2007). Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 448(7153), 561–566. <https://doi.org/10.1038/nature05945>
- Sun, X., & Kaufman, P. D. (2018). Ki-67: More than a proliferation marker. *Chromosoma*, 127(2), 175–186. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0659-8>
- Szadowska, A., Olborski, B., Harezga-Bal, B., & Debiec-Rychter, M. (1999). Expression of P53, MDM2 and Ki-67 antigens in soft tissue sarcomas. *Polish Journal of Pathology*:

- Official Journal of the Polish Society of Pathologists*, 50(1), 9–16.
- Tackmann, N. R., & Zhang, Y. (2017). Mouse modelling of the MDM2/MDMX–p53 signalling axis. *Journal of Molecular Cell Biology*, 9(1), 34–44. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjx006>
- Tait, S. W. G., & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(9), 621–632. <https://doi.org/10.1038/nrm2952>
- Takezawa, K., Okamoto, I., Nishio, K., Janne, P. A., & Nakagawa, K. (2011). Role of ERK-BIM and STAT3-Survivin Signaling Pathways in ALK Inhibitor-Induced Apoptosis in EML4-ALK-Positive Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(8), 2140–2148. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2798>
- Tang, Y., Luo, J., Zhang, W., & Gu, W. (2006). Tip60-Dependent Acetylation of p53 Modulates the Decision between Cell-Cycle Arrest and Apoptosis. *Molecular Cell*, 24(6), 827–839. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.11.021>
- Tanizaki, J., Okamoto, I., Takezawa, K., Sakai, K., Azuma, K., Kuwata, K., Yamaguchi, H., Hatashita, E., Nishio, K., Janne, P. A., & Nakagawa, K. (2012). Combined effect of ALK and MEK inhibitors in EML4–ALK-positive non-small-cell lung cancer cells. *British Journal of Cancer*, 106(4), 763–767. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.586>
- Timofeev, O., Koch, L., Niederau, C., Schneikert, J., Klimovich, M., Elmshäuser, S., Zeitlinger, M., Mernberger, M., Nist, A., Osterburg, C., Dötsch, V., Mouse Clinic Consortium, G., Hrabé de Angelis, M., & Stiewe, T. (2020). Phosphorylation control of p53 DNA binding cooperativity balances tumorigenesis and aging. *Cancer Research*, canres.2002.2020. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2002>
- Timofeev, O., Schlereth, K., Wanzel, M., Braun, A., Nieswandt, B., Pagenstecher, A., Rosenwald, A., Elsässer, H.-P., & Stiewe, T. (2013). P53 DNA Binding Cooperativity Is Essential for Apoptosis and Tumor Suppression In Vivo. *Cell Reports*, 3(5), 1512–1525. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.04.008>
- Todesursachen in Deutschland—Fachserie 12 Reihe 4—2015*. (2015). 51.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012: Global Cancer Statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>
- Uxa, S., Bernhart, S. H., Mages, C. F. S., Fischer, M., Kohler, R., Hoffmann, S., Stadler, P. F., Engeland, K., & Müller, G. A. (2019). DREAM and RB cooperate to induce gene repression and cell-cycle arrest in response to p53 activation. *Nucleic Acids Research*, 47(17), 9087–9103. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz635>
- Ventura, A., Kirsch, D. G., McLaughlin, M. E., Tuveson, D. A., Grimm, J., Lintault, L., Newman, J., Reczek, E. E., Weissleder, R., & Jacks, T. (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*, 445(7128), 661–665. <https://doi.org/10.1038/nature05541>
- Voets, O., Tielen, F., Elstak, E., Benschop, J., Grimbergen, M., Stallen, J., Janssen, R., van Marle, A., & Essrich, C. (2017). Highly efficient gene inactivation by adenoviral CRISPR/Cas9 in human primary cells. *PLOS ONE*, 12(8), e0182974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182974>
- Vogelstein, B. (1990). A deadly inheritance. *Nature*, 348(6303), 681–682. <https://doi.org/10.1038/348681a0>
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10(8), 789–799. <https://doi.org/10.1038/nm1087>
- Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810), 307–310. <https://doi.org/10.1038/35042675>
- Vousden, K. H., & Lu, X. (2002). Live or let die: The cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), 594–604. <https://doi.org/10.1038/nrc864>

- Vousden, K. H., & Ryan, K. M. (2009). p53 and metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 9(10), 691–700. <https://doi.org/10.1038/nrc2715>
- Wakita, D., Chamoto, K., Ohkuri, T., Narita, Y., Ashino, S., Sumida, K., Nishikawa, H., Shiku, H., Togashi, Y., Kitamura, H., & Nishimura, T. (2009). IFN- γ -dependent type 1 immunity is crucial for immunosurveillance against squamous cell carcinoma in a novel mouse carcinogenesis model. *Carcinogenesis*, 30(8), 1408–1415. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp144>
- Walker, K. K., & Levine, A. J. (1996). Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(26), 15335–15340. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15335>
- Wang, S., Zhao, Y., Aguilar, A., Bernard, D., & Yang, C.-Y. (2017). Targeting the MDM2-p53 Protein-Protein Interaction for New Cancer Therapy: Progress and Challenges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(5), a026245. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026245>
- Wang, W., & El-Deiry, W. S. (2008). Restoration of p53 to limit tumor growth. *Current Opinion in Oncology*, 20(1), 90–96. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e3282f31d6f>
- Watanabe, H., Shimokado, K., Asahara, T., Dohi, K., & Niwa, O. (1999). Analysis of the c-myc, K-ras and p53 genes in methylcholanthrene-induced mouse sarcomas. *Japanese Journal of Cancer Research: Gann*, 90(1), 40–47. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1999.tb00663.x>
- Weinberg, R. L., Veprintsev, D. B., Bycroft, M., & Fersht, A. R. (2005). Comparative Binding of p53 to its Promoter and DNA Recognition Elements. *Journal of Molecular Biology*, 348(3), 589–596. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.03.014>
- Weinberg, R. L., Veprintsev, D. B., & Fersht, A. R. (2004). Cooperative Binding of Tetrameric p53 to DNA. *Journal of Molecular Biology*, 341(5), 1145–1159. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.06.071>
- Weksler, M. E., Tsuda, T., Kim, Y. T., & Siskind, G. W. (1990). Immunobiology of aging and cancer. *Cancer Detection and Prevention*, 14(6), 609–611.
- Williams, A. B., & Schumacher, B. (2016). p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(5), a026070. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026070>
- Wu, G. S. (2004). The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 3(2), 156–161. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.2.614>
- Wu, L., Ma, C. A., Zhao, Y., & Jain, A. (2011). Aurora B Interacts with p53, Leading to p53 Phosphorylation in Its DNA-binding Domain and Subsequent Functional Suppression. *Journal of Biological Chemistry*, 286(3), 2236–2244. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.174755>
- Wu, Z., Yang, H., & Colosi, P. (2010). Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging. *Molecular Therapy*, 18(1), 80–86. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.255>
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R. A., Hernando, E., Krizhanovskiy, V., Cordon-Cardo, C., & Lowe, S. W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, 445(7128), 656–660. <https://doi.org/10.1038/nature05529>
- Zilfou, J. T., & Lowe, S. W. (2009). Tumor Suppressive Functions of p53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(5), a001883–a001883. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001883>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: ‚Hallmarks of Cancer‘.	- 11 -
Abbildung 2: Darstellung der p53-Proteindomänen.	- 13 -
Abbildung 3: Die p53 H1-Helix ist von entscheidender Bedeutung für die DNA-Bindungs-Kooperativität.	- 15 -
Abbildung 4: Lokalisation von Ser183 und Ser185 in der p53 H1-Helix.	- 16 -
Abbildung 5: Übersicht des komplexen Netzwerks der p53-Funktionen.	- 18 -
Abbildung 5: Überblick der p53-Regulation durch Mdm2.	- 19 -
Abbildung 7: Generierung der HCT116 Spock-Zelllinie.	- 31 -
Abbildung 8: Gene Targeting zur Erzeugung eines endogenen, murinen TP53 ^{SA} -Allels.	- 32 -
Abbildung 9: Größenmarker für die Gelelektrophorese (links) und für Western-Blot (rechts).	- 36 -
Abbildung 10: Durchführung der intratrachealen Infektion.	- 58 -
Abbildung 11: Generierung der HCT116 Spock-Zelllinie.	- 66 -
Abbildung 12: cDNA-Sequenzierung der p53-Phospho-Mutanten.	- 66 -
Abbildung 13: Western-Blot mit p53- und p21-Proteinleveln nach Induktion durch RG7388.	- 68 -
Abbildung 14: q-RT-PCR mit TP53-Expressionsniveau.	- 69 -
Abbildung 15: Gelelektrophorese der p53-cDNA.	- 69 -
Abbildung 16: Durchflusszytometrie der Phospho-Mutanten zur Analyse des GFP-Signals.	- 70 -
Abbildung 17: Durchflusszytometrie der Phospho-Mutanten zur Analyse des GFP-Signals nach AdCre-Infektion.	- 71 -
Abbildung 18: Western-Blot der neuen Einzelklone mit p53-Proteinleveln nach Induktion durch Nutlin.	- 72 -
Abbildung 19: Immunfluoreszenz der neuen Einzelzellklone mit p53-Lokalisation und Quantifizierung des p53-Levels nach Induktion durch Nutlin.	- 73 -
Abbildung 20: Live-Cell-Imaging-Analyse unter Doxorubicin-Behandlung.	- 75 -
Abbildung 21: FACS-Analyse mit Annexin-V-Färbung nach Doxorubicin-Behandlung.	- 76 -
Abbildung 22: Western-Blot mit Nachweis Apoptose-spezifischer Proteine unter Doxorubicin-Behandlung.	- 77 -
Abbildung 23: q-RT-PCR-Analyse von p53-Zielgenen unter Doxorubicin-Behandlung.	- 78 -
Abbildung 24: Gene Targeting zur Erzeugung eines endogenen, murinen TP53 ^{SA} -Allels.	- 79 -
Abbildung 25: Tumor nach s.c.-Injektion von 3-MC.	- 80 -
Abbildung 26: Überlebenskurven und Vergleich von Tumorparametern nach chemisch induzierter Kanzerogenese.	- 81 -
Abbildung 27: Genomische Struktur des pAd-Cas9-Cre-Eml4-Alk-Vektors.	- 82 -
Abbildung 28: Schema des chromosomalen Rearrangements durch das Ad-Cas9-Cre-Eml4-Alk-Virus.	- 84 -
Abbildung 29: Gelelektrophorese zum Nachweis der Fusionsgene und der spezifischen Deletion.	- 85 -
Abbildung 31: Gaussia-Luciferase-Aktivität nach Ad-Cas9-Cre-Eml4-Alk-Infektion.	- 86 -
Abbildung 32: Firefly-Luciferase-Aktivität nach Ad-Cas9-Cre-Eml4-Alk-Infektion.	- 87 -
Abbildung 33: Kleintier-MRT zum Nachweis CRISPR-induzierter Lungentumoren.	- 88 -
Abbildung 33: Gelelektrophorese zum Nachweis des Eml4-Alk-Fusionsgens aus Lungengewebe der Versuchstiere.	- 89 -
Abbildung 34: Häufigkeit von Tumoren im Vergleich zwischen p53 ^{WT} - und p53 ^{SA} -Mäusen.	- 90 -
Abbildung 35: Histologische Auswertung der Tumorlast.	- 91 -
Abbildung 36: Immunhistochemische Färbung der Lungenpräparate.	- 93 -
Abbildung 37: Scoresheet für den Tierversuch: Chemische Kanzerogenese in p53 ^{SA} -Mäusen.	- 123 -
Abbildung 38: Scoresheet Nr. 1 für den Tierversuch: Suppression Eml4-Alk-induzierter Lungentumorigenese durch die p53 ^{SA} -Phosphomutante.	- 124 -
Abbildung 39: Scoresheet Nr. 2 für den Tierversuch: Suppression Eml4-Alk-induzierter Lungentumorigenese durch die p53 ^{SA} -Phosphomutante.	- 125 -
Abbildung 40: Body Condition Score (BCS).	- 126 -
Abbildung 41: Test der Primer-Effizienz zur Amplifikation des Eml4-Alk-Fusionsgens.	- 127 -

Anhang

Scoresheet

Versuchsvorhaben: chemische Kanzerogenese p53SA

Antragsteller: Dr. Oleg Timofeev

Beobachtung	Parameter	Score
Allgemeinverhalten	aufmerksam, aktiv, Sozialkontakte, bewegt sich normal, neugierig	0
	verminderte Reaktionen, bewegt sich reduziert, eingeschränkte oder überhöhte Aktivität	1
	Kauerhaltung und teilweises Absondern von der Gruppe, bewegt sich reduziert, Schmerzen beim Gehen ersichtlich	2
	apathisch, keine Reaktion oder Aggressivität beim Handling, stark eingeschränkte Bewegung, Isolation, schleppt sich vorwärts	3
Aussehen	glattes, glänzendes Fell, Fellpflege, Augen glänzend	0
	mattes Fell, Fellpflege eingeschränkt oder fehlend, Augen trüb	1
	teilweise struppiges, leicht gestäubtes Fell, Augen-, Nasenausfluss, Augen eingesunken, verklebte Körperöffnungen	2
	vollständig struppiges, stumpfes Fell, abnormale Haltung, gekrümmter Rücken, Augen geschlossen, Zyanose	3
BCS	BCS3	0
	BCS2	2
	BCS1	3
Atmung	normal, gleichmäßig und regelmäßig	0
	geringfügig stärker sichtbare Atmung	1
	deutlich verstärkte Atmung	2
	zyanotische Schleimhäute, nach Luft ringend	3
Tumore	keine Tumore sichtbar oder palpierbar	0
	<0.3 cm Durchmesser	1
	>0.3 bis < 0.5 cm Durchmesser	2
	>0.5 cm Durchmesser oder ulzerierend	3
absolute	Lähmung der betroffenen Hintergliedmaße	3
Abbruchkriterien	Automutilation	3

Kontrollfrequenz: wöchentlich, beim Auftreten von Belastungen täglich

Bewertung (additiv):

0-1	normal
2-3	geringe Belastung
4-7	mittlere Belastung
≥8	schwere Belastung

Erreicht ein Parameter alleine den Score von 3 oder wird ein additiver Score von ≥7 erreicht, wird der Versuch sofort durch Tötung des betroffenen Tieres abgebrochen. Falls Unsicherheit darüber besteht, ob ein einzelner Score von 2 oder 3 anzutreffen ist oder ein kumulativer Score von 6 oder 7, werden wir den zuständigen Tierarzt konsultieren.

Abbildung 37: Scoresheet für den Tierversuch: Chemische Kanzerogenese in p53^{SA}-Mäusen.

Dieses Scoresheet wurde für die kontinuierliche Kontrolle der Versuchstiere über den gesamten Versuch hinweg verwendet, um mögliche Abbruchkriterien frühzeitig zu erkennen.

Scoresheet - Infektion

Versuchsvorhaben: p53SA und Eml4-Alk

Antragsteller: Dr. Oleg Timofeev

Beobachtung	Parameter	Score
Allgemeinverhalten	aufmerksam, aktiv, Sozialkontakte, bewegt sich normal, neugierig	0
	verminderte Reaktionen, bewegt sich reduziert, eingeschränkte oder überhöhte Aktivität	1
	Kauerhaltung und teilweises Absondern von der Gruppe, bewegt sich reduziert, Schmerzen beim Gehen ersichtlich	2
	apathisch, keine Reaktion oder Aggressivität beim Handling, stark eingeschränkte Bewegung, Isolation, schleppt sich vorwärts	3
Aussehen	glattes, glänzendes Fell, Fellpflege, Augen glänzend	0
	mattes Fell, Fellpflege eingeschränkt oder fehlend, Augen trüb	1
	teilweise struppiges, leicht gesträubtes Fell, Augen-, Nasenausfluss, Augen eingesunken, verklebte Körperöffnungen	2
	vollständig struppiges, stumpfes Fell, abnormale Haltung, gekrümmter Rücken, Augen geschlossen, Zyanose	3
BCS	BCS3	0
	BCS2	2
	BCS1	3
Atmung	normal, gleichmäßig und regelmäßig	0
	geringfügig stärker sichtbare Atmung	1
	deutlich verstärkte Atmung	2
	zyanotische Schleimhäute, nach Luft ringend	3
absolute Abbruchkriterien	Aszites	3
	Rektumprolaps	3
	Automutilation	3
	Blutungen aus Mund oder Nase	3

Kontrollfrequenz: täglich

Bewertung (additiv):

0-1	normal
2-3	geringe Belastung
4-7	mittlere Belastung
≥8	schwere Belastung

Erreicht ein Parameter alleine den Score von 3 oder wird ein additiver Score von ≥7 erreicht, wird der Versuch sofort durch Tötung des betroffenen Tieres abgebrochen. Falls Unsicherheit darüber besteht, ob ein einzelner Score von 2 oder 3 anzutreffen ist oder ein kumulativer Score von 6 oder 7, werden wir den zuständigen Tierarzt konsultieren.

Abbildung 38: Scoresheet Nr. 1 für den Tierversuch: Suppression Eml4-Alk-induzierter Lungentumorigenese durch die p53^{SA}-Phosphomutante.

Dieses Scoresheet wurde für die kontinuierliche Kontrolle der Versuchstiere über den gesamten Versuch hinweg verwendet, um mögliche Abbruchkriterien hinsichtlich einer Infektion frühzeitig zu erkennen.

Scoresheet - Tumorerkrankung

Versuchsvorhaben: p53SA und Eml4Alk

Antragsteller: Dr. Oleg Timofeev

Beobachtung	Parameter	Score
Allgemeinverhalten	aufmerksam, aktiv, Sozialkontakte, bewegt sich normal, neugierig	0
	verminderte Reaktionen, bewegt sich reduziert, eingeschränkte oder überhöhte Aktivität	1
	Kauerhaltung und teilweises Absondern von der Gruppe, bewegt sich reduziert, Schmerzen beim Gehen ersichtlich	2
	apathisch, keine Reaktion oder Aggressivität beim Handling, stark eingeschränkte Bewegung, Isolation, schleppt sich vorwärts	3
Aussehen	glattes, glänzendes Fell, Fellpflege, Augen glänzend	0
	mattes Fell, Fellpflege eingeschränkt oder fehlend, Augen trüb	1
	teilweise struppiges, leicht gesträubtes Fell, Augen-, Nasenausfluss, Augen eingesunken, verklebte Körperöffnungen	2
	vollständig struppiges, stumpfes Fell, abnormale Haltung, gekrümmter Rücken, Augen geschlossen, Zyanose	3
BCS	BCS3	0
	BCS2	2
	BCS1	3
Atmung	normal, gleichmäßig und regelmäßig	0
	geringfügig stärker sichtbare Atmung	1
	deutlich verstärkte Atmung	2
	zyanotische Schleimhäute, nach Luft ringend	3
Tumore	keine Tumore sichtbar oder palpierbar	0
	<1 cm Durchmesser	1
	>1 cm <1,5 cm Durchmesser	2
	>1,5 cm Durchmesser oder ulzerierend	3
absolute Abbruchkriterien	Aszites	3
	Rektumprolaps	3
	Automutilation	3

Kontrollfrequenz: wöchentlich, beim Auftreten von Belastungen täglich

Bewertung (additiv):

0-1	normal
2-3	geringe Belastung
4-7	mittlere Belastung
≥8	schwere Belastung

Erreicht ein Parameter alleine den Score von 3 oder wird ein additiver Score von ≥7 erreicht, wird der Versuch sofort durch Tötung des betroffenen Tieres abgebrochen. Falls Unsicherheit darüber besteht, ob ein einzelner Score von 2 oder 3 anzutreffen ist oder ein kumulativer Score von 6 oder 7, werden wir den zuständigen Tierarzt konsultieren.

Abbildung 39: Scoresheet Nr. 2 für den Tierversuch: Suppression Eml4-Alk-induzierter Lungentumorigenese durch die p53^{SA}-Phosphomutante.

Dieses Scoresheet wurde für die kontinuierliche Kontrolle der Versuchstiere über den gesamten Versuch hinweg verwendet, um mögliche Abbruchkriterien hinsichtlich des Tumorwachstums frühzeitig zu erkennen.

Anlage Body Condition Score

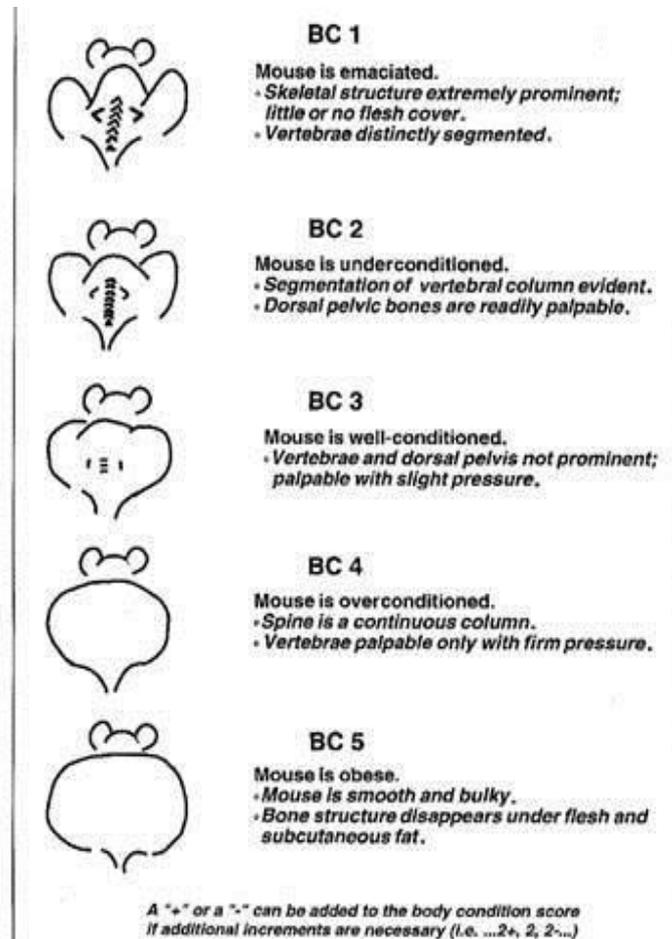


Abbildung 40: Body Condition Score (BCS).

Der *Body Condition Score* wurde angewandt, um den physischen Zustand der Versuchstiere an äußeren Merkmalen objektiv beurteilen zu können und somit den Belastungsgrad einzuschätzen.

Eml4-Alk Primer Effizienz

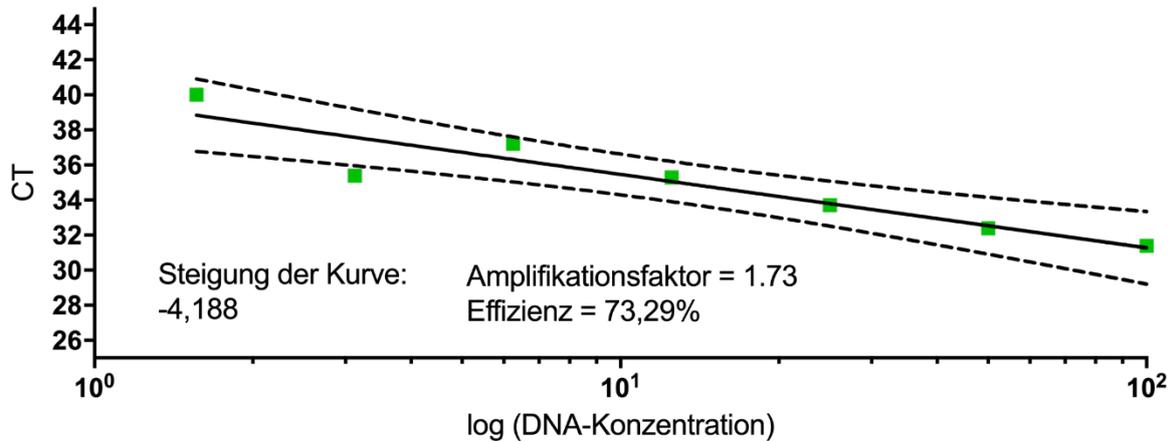


Abbildung 41: Test der Primer-Effizienz zur Amplifikation des *Eml4-Alk-Fusionsgens*.

Es wurden zunächst 100 ng gDNA in einer 1:2 Verdünnungsreihe angesetzt und anschließend mittels q-RT-PCR mit den entsprechenden Primern (siehe Abschnitt 5.5.2) für das *Eml4-Alk-Fusionsgen* analysiert. Die ermittelten Ct-Werte wurden anschließend auf einer logarithmischen Skala gegen die Nukleinsäurekonzentrationen aufgetragen. Danach wurde eine lineare Regressionskurve durch die ermittelten Ct-Werte gelegt und deren Steigung bestimmt. Die Effizienz wurde schließlich mit folgender Formel bestimmt:

$$E = -1 + 10^{\left(-\frac{1}{\text{Steigung}_{\text{Kurve}}}\right)}$$

Verzeichnis der akademischen Lehrenden

Meine akademischen Lehrenden in Marburg waren:

Vorklinischer Studienabschnitt:

Basler, Baranovski, Bauer, Bette, Bertoune, Braun, Brehm, Bonaterra, Cetin, Daut, Decher, del Rey, Eickmann, Feuser, Grundmann, Hildebrandt, Hobiger, Koolman, Lill, Löffler, Mey, Milani, Mueller, Neumüller, Oberwinkler, Oliver, Preisig-Müller, Reese, Rost, Röhm, Rust, Schratt, Schütz, Schwarz, Seitz, Steiniger, Stiewe, Suske, Timofeev, Thieme, Wanzel, Weihe, Wertbruch, Westermann, Westermann, Wilhelm, Wrocklage

Klinischer Studienabschnitt:

Aigner, Al-Fakhri, Arenz, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Becker, Bender, Best, Bien, Bliemel, Bohlander, Burchert, Carl, Czubayko, Damanakis, Dettmeyer, Divchev, Donner-Banzhoff, Duda, Ehlenz, Eming, Fendrich, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Gebhardt, Geks, Geraedts, Görg, Gress, Greulich, Grikscheit, Grimm, Grosse, Grzeschik, Hertl, Hoch, Höffken, Hofmann, Holland, Holzer, Hoyer, Jansen, Jerrentrup, Josephs, Kampmann, Kann, Keber, Kill, Kirschbaum, Klemmer, Klose, Knipper, Koczulla, Köhler, König, Kühnert, Lohoff, Lüsebrink, Mahnken, Maier, Maisner, Maurer, Menzler, Moll, Morin, Mossdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Nimsky, Oberkircher, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Parahuleva, Peterlein, Pfützner, Portig, Pöttgen, Plant, Rastan, Renke, Renz, Richter, Riera-Knorrenschild, Rothmund, Ruchholtz, Rüschi, Schäfer, Schieffer, Schmeck, Schmidt, Schneider, Schu, Seifert, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sieveking, Sommer, Stuck, Strik, Tackenberg, Thum, Timmermann, Timmesfeld, Vogelmeier, Vogt, Vojnar, Wagner, Werner, Wiesmann, Wissniowski, Wittig, Worzfeld, Wulf, Zavorotny, Zemlin, Ziller, Zimmer, Zwiorek

Danksagung

Hiermit möchte ich all denjenigen danken, die mich vom ersten Gedanken an eine Promotion bis hin zum Abschluss begleitet und unterstützt haben.

Vielen Dank an Thorsten für die Möglichkeit, die Arbeit in deinem Institut durchführen zu dürfen sowie für den immer freundlichen und wertschätzenden Umgang.

Ein riesiges Dankeschön gilt auch Oleg, in dessen Mausgruppe ich aufgenommen wurde und der mir für alle Experimente die theoretischen und praktischen Grundlagen beigebracht hat – auch wenn das manchmal bestimmt viel Geduld gekostet hat.

Ich möchte außerdem Lukas danken, mit dem ich gemeinsam das Projekt „Doktorarbeit“ angegangen bin und mit dem ich sowohl im Labor als auch darüber hinaus viel diskutiert und viel gelacht habe.

Natürlich gilt mein Dank auch allen anderen Mitarbeitenden, Promovierenden sowie Bachelor- und Master-Studierenden, die ich im Laufe meiner Zeit im Labor kennenlernen durfte. Danke für die fachliche und nervliche Unterstützung, die guten Tipps und die Abwechslung in der Mittagspause oder bei der Arbeit. Ich werde die Zeit im Labor immer gut in Erinnerung behalten!

Schließlich gilt mein größter Dank meinen Freunden und meiner Familie, die mich bei der Entscheidung zu einer experimentellen Promotion unterstützt und auch während der vielen Jahre vom Beginn bis zur Abgabe begleitet haben.

Insbesondere ohne meine Familie wäre ich nicht bis zu diesem Punkt gekommen – DANKE!