

Aus dem Institut für Molekulare Onkologie

Direktor: Prof. Dr. Thorsten Stiewe

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Systematische Analyse der Fitness-Effekte von
TP53-Mutationen in Tumorzellen unter
Nährstoffmangel und Aktivierung von p73**

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER GESAMTEN HUMANMEDIZIN

DEM FACHBEREICH MEDIZIN DER PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG,

VORGELEGT VON

ANNA BOROWEK

AUS DATTELN

MARBURG, 2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am
27.11.2023

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekanin: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. Thorsten Stiewe

1. Korreferent: Prof. Dr. Andreas Burchert

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 7 |
| TABELLENVERZEICHNIS | 9 |
| ABKÜRZUNGS- UND SYMBOLVERZEICHNIS | 11 |
| 1. EINLEITUNG | 17 |
| 1.1. TP53 | 17 |
| 1.1.1. p53 - Wächter des Genoms | 17 |
| 1.1.2. p53-Mutationen..... | 18 |
| 1.1.3. Auswirkungen von p53-Mutationen | 19 |
| 1.2. p53 im Metabolismus | 22 |
| 1.2.1. p53 im Glukosestoffwechsel..... | 22 |
| 1.2.2. p53 im Glutaminstoffwechsel | 26 |
| 1.3. p73 | 28 |
| 1.3.1. Struktur und Funktion von p73 | 28 |
| 1.3.2. Interaktion von MTP53 mit p73..... | 29 |
| 1.4. Personalisierte Medizin | 30 |
| 1.4.1. p53 als pharmakologisches Ziel..... | 31 |
| 1.5. Zielsetzung der Arbeit | 32 |
| 2. MATERIAL UND METHODEN | 35 |
| 2.1. Material | 35 |
| 2.1.1. Zelllinien und Bakterienstämme | 35 |
| 2.1.2. Plasmide..... | 36 |
| 2.1.3. Oligonukleotide | 36 |
| 2.1.4. Antikörper..... | 37 |
| 2.1.5. Viren | 37 |
| 2.1.6. Enzyme | 37 |
| 2.1.7. Sequenzen und Bezeichnungen der R175-Library | 38 |
| 2.1.8. Chemikalien und Reagenzien | 39 |
| 2.1.9. Puffer und Lösungen..... | 40 |
| 2.1.10. Medien, Antibiotika und Zusatzstoffe | 41 |
| 2.1.11. Kits | 42 |
| 2.1.12. Laborgeräte | 43 |
| 2.1.13. Verbrauchsmaterialien | 45 |
| 2.1.14. Programme | 47 |
| 2.2. Zellbiologische Methoden | 47 |
| 2.2.1. Kultivierung von Zellen..... | 47 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.2.2. | Einfrieren und Auftauen von Zellen | 48 |
| 2.2.3. | Zellzahlbestimmung..... | 48 |
| 2.2.4. | Zellen unter Nährstoffmangel setzen | 49 |
| 2.2.5. | Zellbehandlung mit Medikamenten | 49 |
| 2.2.6. | Transfektion mit Lipofectamine® 2000 | 49 |
| 2.2.7. | Selektion mit Puromycin | 50 |
| 2.2.8. | Lentiviraler Gentransfer..... | 50 |
| 2.2.9. | Selektion mit Geneticin | 51 |
| 2.2.10. | Verwendung des pInducer20 Vektors..... | 51 |
| 2.2.11. | Adenovirale Cre Rekombinase Infektion..... | 52 |
| 2.2.12. | Generierung von Einzelzellklonen,..... | 52 |
| 2.2.13. | Funktionelle Charakterisierung der Einzelzellklone..... | 53 |
| 2.2.14. | Koloniebildungstest (<i>Colony Formation Assay</i>)..... | 53 |
| 2.2.15. | Durchflusszytometrie (<i>FACS</i>)..... | 53 |
| 2.2.16. | Ernten von Zellen..... | 56 |
| 2.3. | Molekularbiologische Methoden | 57 |
| 2.3.1. | <i>CRISPR/Cas9</i> | 57 |
| 2.3.2. | Elektrotransformation von Bakterien..... | 57 |
| 2.3.3. | Midi-Plasmid Präparation | 57 |
| 2.3.4. | Isolierung genomischer DNA | 58 |
| 2.3.5. | Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration mittels NanoDrop..... | 58 |
| 2.3.6. | Polymerasekettenreaktion (<i>PCR</i>)..... | 58 |
| 2.3.7. | <i>Nested PCR</i> | 58 |
| 2.3.8. | Vorbereitung der Amplikon Library Sequenzierung..... | 60 |
| 2.3.9. | Amplikon Sequenzierung | 61 |
| 2.4. | Proteinbiochemische Methoden | 61 |
| 2.4.1. | Herstellung von Zelllysaten | 61 |
| 2.4.2. | Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford..... | 62 |
| 2.4.3. | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese..... | 62 |
| 2.4.4. | Western Blot | 63 |
| 2.4.5. | Immundetektion | 64 |
| 3. | ERGEBNISSE..... | 65 |
| 3.1. | Analyse der proliferativen Fitness-Effekte von R175-Mutationen unter MDM2-Inhibition | 65 |
| 3.1.1. | Expression einer R175-Mutationslibrary in HCT116-Zellen | 65 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 3.1.2. | Analyse der proliferativen Fitness-Effekte von <i>TP53^{R175}</i> -Mutationen unter MDM2-Inhibition | 67 |
| 3.2. | Analyse der proliferativen Fitness-Effekte von <i>TP53^{R175}</i>-Mutationen in Nährstoffmangelzuständen..... | 69 |
| 3.2.1. | Fitness-Effekte von <i>TP53^{R175}</i> -Mutationen unter HBSS..... | 69 |
| 3.2.2. | Fitness-Effekte von <i>TP53^{R175}</i> -Mutationen unter Glukoseentzug..... | 70 |
| 3.2.3. | Fitness-Effekte von <i>TP53^{R175}</i> -Mutationen unter Glutaminentzug..... | 71 |
| 3.3. | Analyse des GOF-Effekts von <i>TP53^{R175}</i>-Mutationen in Bezug auf p73 | 73 |
| 3.3.1. | Doxycyclin-abhängige Expression von TAp73 in polyklonalen HCT116 <i>TP53^{A/LSL}</i> -Zelllinien | 74 |
| 3.3.2. | Doxycyclin-abhängige Expression von TAp73 in HCT116 <i>TP53^{A/LSL}</i> TAp73 Einzelzellklonen | 75 |
| 3.3.3. | Funktionelle Charakterisierung der HCT116 <i>TP53^{A/LSL}</i> TAp73 Einzelzellklone | 78 |
| 3.3.4. | Integration der R175-Library in die HCT116 <i>TP53^{A/LSL}</i> TAp73 Einzelzellklone | 85 |
| 3.3.5. | <i>TP53^{R175}</i> -Mutationen unter Expression von TAp73 | 87 |
| 4. | DISKUSSION | 93 |
| 4.1. | Fitness-Effekte von <i>TP53^{R175}</i>-Mutationen in Nährstoffmangelzuständen | 94 |
| 4.1.1. | HBSS als metabolischer Stressauslöser | 94 |
| 4.1.2. | <i>TP53^{R175}</i> -Mutationen unter Glukoseentzug | 94 |
| 4.1.3. | <i>TP53^{R175}</i> -Mutationen unter Glutaminentzug | 95 |
| 4.1.4. | Zusammenfassung der Fitness-Effekte von <i>TP53^{R175}</i> -Mutationen und Ausblick..... | 95 |
| 4.2. | Untersuchung des GOF-Effekts von <i>TP53^{R175}</i>-Mutationen in Bezug auf p73 | 96 |
| 4.2.1. | <i>TP53^{R175}</i> -Mutationen unter Expression von TAp73 α | 97 |
| 4.3. | Mögliche Beeinflussung der Ergebnisse | 98 |
| 4.3.1. | Die Rolle von Geneticin | 98 |
| 4.3.2. | Einfluss des Codon 72-Polymorphismus..... | 98 |
| 4.3.3. | Akkumulation und Selektionsdruck nicht ausreichend für den Nachweis eines GOF | 99 |
| 4.4. | Fazit und Ausblick..... | 99 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNGEN | 101 |
| 5.1. | Zusammenfassung | 101 |
| 5.2. | Summary | 102 |

| | |
|---|------------|
| LITERATURVERZEICHNIS | 103 |
| LEBENS LAUF | 115 |
| VERZEICHNIS AKADEMISCHER LEHRENDER | 116 |
| DANKSAGUNG | 117 |
| EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG | 118 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Mutationshäufigkeit verschiedener Gene in unterschiedlichen Tumorentitäten | 17 |
| Abbildung 2: Verteilung der <i>TP53</i> Mutationen | 19 |
| Abbildung 3: Effekte von mutiertem p53 | 22 |
| Abbildung 4: p53 im Glukosestoffwechsel | 24 |
| Abbildung 5: MTp53 im Glukosestoffwechsel | 26 |
| Abbildung 6: CRISPR Editierung der <i>TP53R175</i>-Mutationslibrary | 33 |
| Abbildung 7: Vorgehensweise zur Untersuchung der Auswirkungen der Mutationen auf die Proteinfunktion | 34 |
| Abbildung 8: Gates Durchflusszytometrie mit Propidiumiodid | 55 |
| Abbildung 9: Gates Durchflusszytometrie mit BrdU | 56 |
| Abbildung 10: CRISPR Editierung des <i>TP53</i>-Gens in HCT116 Zellen und Cre-vermittelte Rekombination | 66 |
| Abbildung 11: Fitness-Effekte von <i>TP53^{R175}</i>-Mutationen unter MDM2-Inhibition | 68 |
| Abbildung 12: Fitness-Effekte von <i>TP53^{R175}</i>-Mutationen unter HBSS | 70 |
| Abbildung 13: Fitness-Effekte von <i>TP53^{R175}</i>-Mutationen unter Glukoseentzug | 71 |
| Abbildung 14: Fitness-Effekte von <i>TP53^{R175}</i>-Mutationen unter Glutaminentzug | 73 |
| Abbildung 15: Experimentelles Procedere zur Analyse des GOF-Effekts von <i>TP53^{R175}</i>-Mutationen in Bezug auf p73 | 74 |
| Abbildung 16: Nachweis der Doxycyclin-induzierten Expression von TAp73 | 75 |
| Abbildung 17: Nachweis der Doxycyclin-induzierten Expression von TAp73α in Einzelzellklonen | 77 |
| Abbildung 18: Nachweis der Doxycyclin-induzierten Expression von TAp73β in Einzelzellklonen | 78 |
| Abbildung 19: p73- vermittelte Apoptose in HCT116 <i>TP53^{Δ/LSL}</i> TAp73α Einzelzellklonen | 80 |
| Abbildung 20: p73- vermittelter Zellzyklusarrest in HCT116 <i>TP53^{Δ/LSL}</i> TAp73α Einzelzellklon #3 | 81 |
| Abbildung 21: p73- vermittelte Apoptose in HCT116 <i>TP53^{Δ/LSL}</i> TAp73β Einzelzellklonen | 83 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 22: p73- vermittelter Zellzyklusarrest in HCT116 $TP53^{A/LSL}$ TAp73β Einzelzellklon #3 | 84 |
| Abbildung 23: Integration der R175-Library in die HCT116 $TP53^{A/LSL}$ TAp73 Einzelzellklone | 86 |
| Abbildung 24: HCT116 $TP53^{A/LSL-R175-Library}$ TAp73α Behandlung mit Nutlin oder Doxycyclin | 88 |
| Abbildung 25: HCT116 $TP53^{A/LSL-R175-Library}$ TAp73α Behandlung mit der Kombination Nutlin und Doxycyclin | 89 |
| Abbildung 26 HCT116 $TP53^{A/-R175-Library}$ TAp73α Behandlung mit Nutlin unterschiedliche Zeitspannen | 90 |
| Abbildung 27: HCT116 $TP53^{A/-R175-Library}$ TAp73α Behandlung mit der Kombination Nutlin und Doxycyclin in der Langzeitkultur | 91 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Zelllinien | 35 |
| Tabelle 2: Bakterienstämme..... | 35 |
| Tabelle 3: Plasmide | 36 |
| Tabelle 4: Oligonukleotide..... | 36 |
| Tabelle 5: Primärantikörper | 37 |
| Tabelle 6: Sekundärantikörper | 37 |
| Tabelle 7: Viren..... | 37 |
| Tabelle 8: Enzyme..... | 37 |
| Tabelle 9 Sequenzen und Bezeichnungen der R175-Library | 38 |
| Tabelle 10: Chemikalien und Reagenzien..... | 39 |
| Tabelle 11: Puffer und Lösungen | 40 |
| Tabelle 12: Medien, Antibiotika und Zusatzstoffe..... | 41 |
| Tabelle 13: Kits | 42 |
| Tabelle 14: Laborgeräte | 43 |
| Tabelle 15: Verbrauchsmaterialien | 45 |
| Tabelle 16: Programme | 47 |
| Tabelle 17: Transfektion mit Lipofectamine® 2000..... | 50 |
| Tabelle 18: Herstellung von Lentiviren mit Calciumphosphat | 51 |
| Tabelle 19: Färbemischung Propidiumiodid | 54 |
| Tabelle 20: Reagenzien und Thermocycler-Programm <i>Nested</i> PCR I..... | 59 |
| Tabelle 21: Reagenzien und Thermocycler-Programm <i>Nested</i> PCR II (Barcode PCR) | 60 |
| Tabelle 22: Probenzusammensetzung SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese..... | 63 |
| Tabelle 23: Vorbehandlung der PVDF-Membran..... | 63 |
| Tabelle 24: Anordnung der Gelkassette | 64 |
| Tabelle 25: Zusammenfassung der Charakterisierung der HCT116 <i>TP53^{Δ/LSL}</i> TAp73α Einzelzellklone..... | 82 |

| | |
|--|----|
| Tabelle 26: Zusammenfassung der Charakterisierung der HCT116 <i>TP53^{Δ/LSL}</i> TAp73β Einzelzellklone..... | 85 |
|--|----|

ABKÜRZUNGS- UND SYMBOLVERZEICHNIS

| Abkürzung | Bedeutung |
|------------------|---|
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µM | Mikromolar |
| 2-DG | 2-Deoxyglucose |
| ADP | Adenosindophosphat |
| AIF | Apoptosis inducing factor |
| AML | Acute Myeloid Leukemia |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| AMPK | AMP activated protein kinase |
| APC | Adenomatous polyposis coli |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BAG | Bcl-2-associated athanogene |
| Bax | Bcl-2-associated X protein |
| BCR | Breakpoint cluster region |
| BisTris | Bis(2-hydroxyethyl)amino- tris(hydroxymethyl)methan |
| BLCA | Bladder Cancer |
| BRAF | B-rapidly accelerated fibrosarcoma |
| BRCA | Breast Cancer |
| BRCA1 | Breast Cancer Gene 1 |
| BrdU | 5-Bromo-2'-deoxyuridine |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| Cas | CRISPR-associated |
| CDKN1A | Cyclin dependant kinase inhibitor 1a (p21) |
| ChIP | Carboxyl terminus of HSC70-interacting protein (E3 Ubiquitin Ligase) |
| cm | Zentimeter |
| COAD/READ | Colorectal Adenocarcinoma |
| CRISPR | Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats |

| | |
|--------------------|---|
| d | Tag |
| DBD | DNA-binding-domain |
| Dia. | Dialysiert |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DN | Dominant negativ |
| DNA | Desoxyribonucleic acid |
| dNTPs | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| DPBS | Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline |
| EDTA | Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat |
| FACS | Fluorescence activated cell sorting |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| FITC | Fluorescein-5-isothiocyanat |
| Fold change | Größenmaß: das Verhältnis eines Wertes in Bezug auf den Originalwert |
| g | Gramm |
| G6PD | Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase |
| GADD45A | Growth arrest and DNA damage inducible alpha |
| GBM | Glioblastoma multiforme |
| gDNA | Genomische DNA |
| GLS 2 | Glutaminase 2 |
| GOF | Gain of function |
| GRAMD4 | GRAM domain containing 4 |
| HBSS | Hanks' Balanced Salt solution |
| HDR | Homolgy directed repair |
| Heatmap | Diagramm zur Visualisierung von Daten anhand eines Farbverlaufs |
| HK II | Hexokinase Typ II |
| HNSC | Head and neck squamous cell carcinoma |
| HSP90 | Heat shock protein 90 |
| IKK | Inhibitory kappa B Kinase |
| KCl | Kaliumchlorid |

| | |
|---------------------|---|
| KIRC | Kidney renal clear cell carcinoma |
| KRAS | Kirsten rat sarcoma virus |
| Library | Sammlung von Genvarianten |
| LOF | Loss of function |
| LSL-Kassette | LoxP-Stop-loxP-Kassette |
| LUAD | Lung adenocarcinoma |
| LUSC | Lung squamous cell carcinoma |
| Mdm2 | Mouse double minute 2 |
| ME | Malic enzyme |
| MES | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure |
| mg | Milligramm |
| ml | Milliliter |
| MOI | Multiplicity of infection |
| MPC | Mitochondrial pyruvate carrier |
| MTOR | Mammalian target of rapamycin |
| mTORC1 | Mammalian target of rapamycin complex 1 |
| MTp53 | Mutiertes p53 |
| MW | Mediumwechsel |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NAMPT | Nicotinamid Phosphoribosyltransferase |
| NF-Y | Nuclear transcription factor Y |
| NF-κB | Nuclear transcription factor kappa B |
| NGS | Next generation sequencing |
| nm | Nanometer |
| NMD | Nonsense mediated decay |
| NP-40 | Nonylphenyl Polyethylene Glycol |
| NSCLC | Non-small-cell-lung-cancer |
| Nutlin | Nutlin-3 |
| OV | Ovarian Cancer |
| pac | Puromycin-N-Acetyltransferase |
| PAM | Protospacer adjacent motif |
| PDC | Pyruvatdehydrogenase Complex |

| | |
|-----------------|---|
| PDFKB3/4 | 6-Phosphofrukto-2-kinase/Fruktose-2,6-biphosphatase 3/4 |
| PDGFRb | Platelet-derived growth factor receptor beta |
| Pdk2 | Pyruvatdehydrogenase-kinase |
| PE | Phycoerythrin |
| PFK1 | Phosphofruktokinase 1 |
| PGM | Phosphoglyceratmutase |
| pLOF | Partial loss of function |
| PPP | Pentose phosphate pathway |
| PR | Proline rich |
| PUMA | P53 Upregulated Modulator of Apoptosis |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| Rb | Retinoblastoma |
| RETRA | Reactivation of transcriptional reporter activity |
| RNA | Ribonucleic acid |
| ROCK | Rho-associated protein kinase |
| ROS | Reactive oxygen species |
| SCO2 | Synthesis of Cytochrome c Oxidase 2 |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| sgRNA | Single guide ribonucleic acid |
| SLC1A3 | Soluble-like carrier family 7, member 3 (Aspartat/Glutamat-Transporter) |
| SLC7A3 | Soluble-like carrier family 7, member 3 (Arginintransporter) |
| TA | Transactivation |
| TAD | Transactivation domain |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TBST | Tris-buffered saline with Tween20 |
| TIGAR | TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator |
| TP53 | Tumor protein 53 |
| TP73 | Tumor protein 73 |

| | |
|------------------------------|--------------------------------------|
| UCEC | Uterine corpus endometrial carcinoma |
| USER | Uracil-Specific Excision Reagent |
| V | Volt |
| WT | Wildtyp |
| WTp53 | Wildtyp-p53 |
| α | Alpha |
| β | Beta |
| γ | Gamma |
| δ | Delta |
| Δ | delta |
| ϵ | Epsilon |
| ζ | Zeta |
| η | Eta |

| Buchstabencode | Aminosäure |
|-----------------------|-------------------|
| A | Alanin |
| C | Cystein |
| D | Asparaginsäure |
| E | Glutaminsäure |
| F | Phenylalanin |
| G | Glycin |
| H | Histidin |
| I | Isoleucin |
| K | Lysin |
| L | Leucin |
| M | Methionin |
| N | Asparagin |
| P | Prolin |
| Q | Glutamin |
| R | Arginin |
| S | Serin |
| T | Threonin |
| V | Valin |

W Tryptophan

Y Tyrosin

1. EINLEITUNG

1.1.TP53

1.1.1. p53 - Wächter des Genoms

TP53 wurde im Jahr 1979 entdeckt (Levine and Oren, 2009), liegt auf Chromosom 17 (Baker et al., 1989) und ist das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Tumoren (Kandoth et al., 2013). Mutationen des Tumorsuppressors p53 finden sich in fast allen Tumorentitäten und in ca. 50 % aller Tumore (Liu et al., 2015). Die Mutationshäufigkeit variiert zwischen ca. 10 % in hämatopoetischen Krebserkrankungen, 30 % in Mammakarzinomen, 50 – 60 % in kolorektalen Karzinomen und bis zu 90 % in Ovarialkarzinomen (Kandoth et al., 2013).

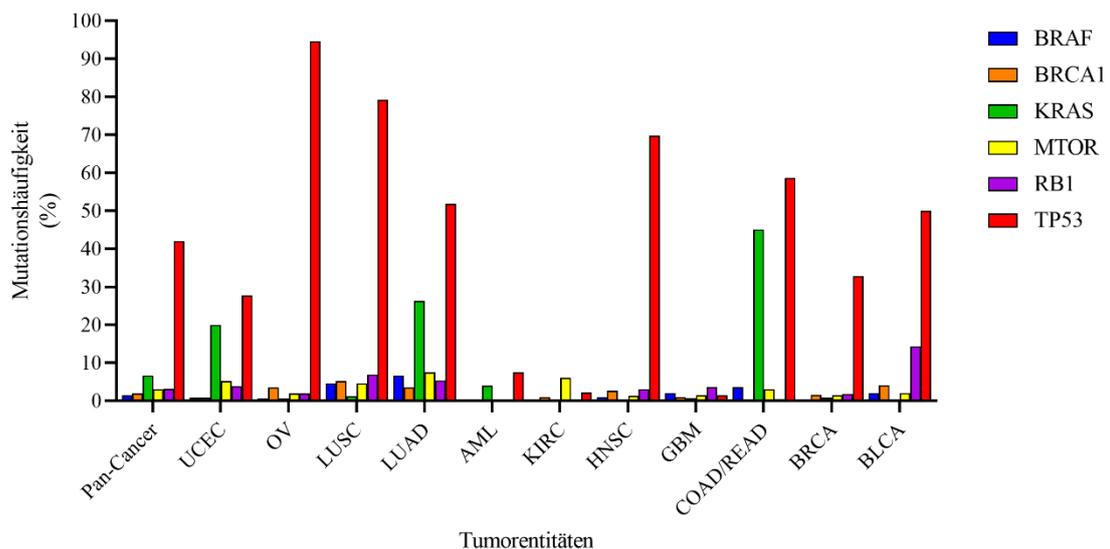


Abbildung 1: Mutationshäufigkeit verschiedener Gene in unterschiedlichen Tumorentitäten
 Basierend auf Daten aus Kandoth et al., 2013

Die Proteinstruktur von p53 besteht aus einer Transaktivierungsdomäne (TAD), einer Prolin-reichen-Region (PRR), welche zudem eine weitere Transaktivierungsdomäne beinhaltet sowie einer DNA-Bindungsdomäne (DBD), einer Oligomerisierungsdomäne (OD) und einer C-terminalen regulatorischen Domäne (CTD) (Freed-Pastor and Prives, 2012).

Ohne zellulären Stress wird p53 Ubiquitin-vermittelt abgebaut, woran vor allem die E3 Ubiquitin-Ligase *Mouse double minute 2* (MDM2) beteiligt ist (Brosh and Rotter, 2009). P53 und MDM2 befinden sich in einer gegenseitigen Feedback-Schleife und p53 reguliert

die Transkription des *Mdm2*-Gens (Vogelstein et al., 2000). Zwei weitere Mechanismen, durch die MDM2 p53 hemmt, sind die Behinderung der Transaktivierungsfunktion und der Transport aus dem Nukleus heraus (Wang et al., 2017). Auch bekannt als „Wächter des Genoms“ („guardian of the genome“ (Lane, 1992)) erfüllt p53 diverse Aufgaben in der Zelle. Im Fall von DNA-Schäden, Nährstoffentzug, Hypoxie oder Onkogen-Aktivierung wird p53 posttranslational modifiziert, dadurch stabilisiert und akkumuliert in der Zelle (Liu et al., 2015). In Abhängigkeit des Stresssignals und des Zelltyps aktiviert es Zielgene, um einen Zellzyklusarrest zu erreichen und mithilfe von DNA-Reparaturmechanismen den Schaden zu beseitigen. Bei irreparablen Schaden oder anhaltendem Stress induziert p53 Gene, die an Apoptose oder Seneszenz beteiligt sind, um die Anreicherung von geschädigten Zellen zu verhindern (Liu et al., 2015).

1.1.2. p53-Mutationen

Im Gegensatz zu vielen anderen Tumorsuppressorgenen wie z.B. *APC* oder *RBI*, besteht der Großteil der p53-Mutationen aus einzelnen Missense-Mutationen, die eine Aminosäureänderung in einem normalgroßen Protein zur Folge haben (Freed-Pastor and Prives, 2012). Deletionen, Frameshift- oder Nonsense-Mutationen, die zu Funktionsverlust und fehlendem Protein führen, sind sehr viel seltener (Baugh et al., 2018).

80 % der Mutationen liegen in der DBD (Biegging et al., 2014) und die Codons, die mit 28 % am häufigsten von Mutationen betroffen sind (Baugh et al., 2018), werden als *hotspots* bezeichnet und liegen an den Codons R175, G245, R248, R249, R273 sowie R282 (Chiang et al., 2021) (s. Abbildung 2).

Mutiertes p53 (MTp53) kann grundsätzlich durch ähnliche Mechanismen wie Wildtyp-p53 (Wtp53) reguliert werden, jedoch können andere Veränderungen während der Tumorentstehung dazu führen, dass diese Regulation gestört wird und p53 akkumuliert (Freed-Pastor and Prives, 2012). Ein Beispiel ist die Kooperation mit dem HSP90 Chaperon Weg, welcher die Aktivität der E3 Ubiquitin-Ligasen MDM2 und CHIP einschränkt (Zhu et al., 2020).

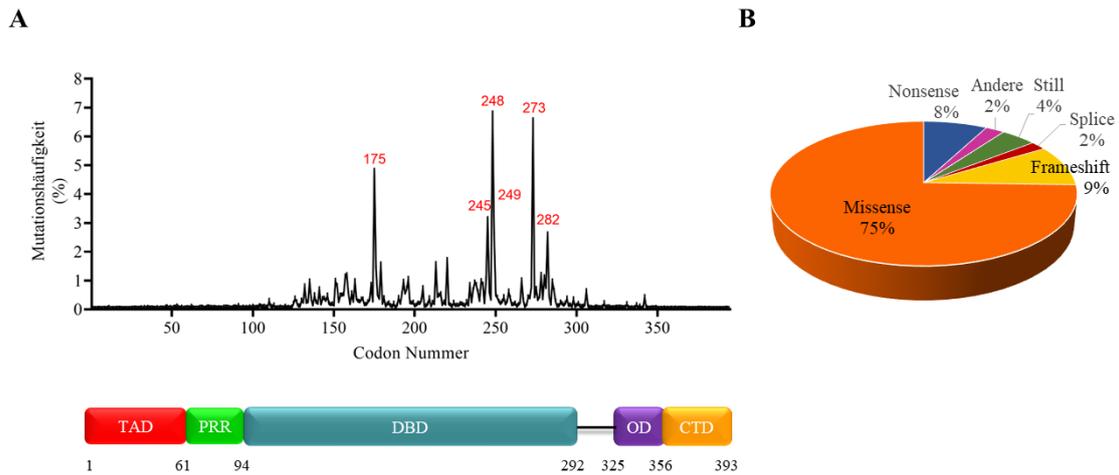


Abbildung 2: Verteilung der TP53 Mutationen

(A) Häufigkeitsverteilung der Mutationen von TP53, Abbildung basierend auf Daten von The TP53 Database | ISB-CGC, 2022, modifiziert nach Joerger and Fersht, 2010. (B) Verteilung der Mutationsarten, modifiziert nach Brosh and Rotter, 2009.

Die Missense-Mutationen lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Konformations- und Kontaktmutationen. Durch einige Mutationen wird die Proteinfaltung so gestört, dass die Konformation lokal anders als die des WT-Proteins ist, z.B. R249S und G245S oder sogar global wie durch R175H und R282W. Durch Mutationen wie R248Q und R273H werden DNA-Kontaktpunkte zerstört (Brosh and Rotter, 2009). Nicht nur Mutationen an verschiedenen Codons haben unterschiedliche Auswirkungen auf das Protein, sondern auch unterschiedliche Aminosäuren an derselben Stelle im Protein: Yoshikawa et al. fanden 2010 heraus, dass Lungentumorzellen mit einer p53R248Q-Mutation deutlich invasiver als mit einer p53R248W-Mutation in ursprünglich p53-negativen H1299-Zellen waren.

1.1.3. Auswirkungen von p53-Mutationen

1.1.3.1. Loss of function

Mutationen von TP53 können verschiedene Auswirkungen auf das Protein haben. Eine mögliche Folge ist ein *Loss of function* (LOF). Das bedeutet, dass p53 nicht mehr dazu in der Lage ist, Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und Apoptose zu induzieren und so seine tumorsuppressiven Eigenschaften verliert (Hernández Borrero and El-Deiry, 2021). Dies beeinträchtigt die generelle Fähigkeit der Zelle zur Verhinderung der Tumorentstehung (Oren and Rotter, 2010). Für vorzeitige Stop-Codons und Frameshift-Mutationen konnte

gezeigt werden, dass sie zu einem starken Funktionsverlust von p53 führen (Kotler et al., 2018).

1.1.3.2. Partial Loss of function

Neben den Mutationen, die zu einem vollständigen Funktionsverlust des p53-Proteins führen, gibt es welche, die einen Teil der Wildtyp-p53 Aktivität beibehalten (Kato et al., 2003). Dieser teilweise Verlust der tumorsuppressiven Eigenschaften wird als *partial Loss of function* (pLOF) bezeichnet (Kovvali et al., 2001). R175P kann z.B. als Reaktion auf DNA-Schädigungen Apoptose nicht induzieren, jedoch p21-vermittelt Zellzyklusarrest und Seneszenz aktivieren (van Nguyen et al., 2007).

1.1.3.3. Dominant-negativer Effekt

Mutiertes p53 kann des Weiteren die Funktion des verbleibenden Wildtyp-Allels beeinträchtigen. Durch die Bildung von Heterotetrameren entstehen Komplexe, die die DNA-Bindung von WTP53 und damit die Aktivierung von Zielgenen behindern. Dies wird als dominant-negativer Effekt (DN) bezeichnet (Kim and Lozano, 2018).

1.1.3.4. Gain of function

Die dritte Variante beschreibt den Zugewinn neuer Fähigkeiten von mutiertem p53, welche nicht denen des WT-Proteins entsprechen, sog. *gain of function* (GOF) (Oren and Rotter, 2010, s. Abbildung 3). Die Vorstellung, dass Missense-Mutationen einen GOF bedingen könnten, kam auf, als Missense-Mutationen in p53-negative Zellen eingebracht wurden und neue Fähigkeiten der Zellen entstanden: schnellere Zellteilung und Expression von Medikamentenresistenzgenen (Dittmer et al., 1993). Außerdem entwickeln Mäuse mit MTP53 eine Vielzahl anderer Karzinome als p53-negative Mäuse (Olive et al., 2004). Tumorzellen weisen jedoch zellspezifische Unterschiede in den Auswirkungen von MTP53 auf, und verschiedene Mutationen erzeugen einen anderen Phänotyp (Dittmer et al., 1993). Je nach Mutation entstehen auch unterschiedliche Tumorentitäten. Mäuse mit TP53-Mutationen im Codon 270, welches Codon 273 im Menschen entspricht, entwickeln Lungenadenokarzinome und B-Zell-Lymphome. Mutationen im Codon 172, Codon 175 im Menschen entsprechend, bedingen die Ausbildung von Osteosarkomen, die zudem häufiger weitere Tumorabsiedlungen bilden (Olive et al., 2004). Dementsprechend begünstigt MTP53 *in vivo* als zusätzliche Eigenschaft Metastasierung (Lang et al., 2004). Auf der anderen Seite verringert die

Depletion von MTP53 die Zellkoloniebildung *in vitro* und das Tumolvolumen *in vivo* (Bossi et al., 2008).

Neben der gesteigerten Proliferation und den Resistenzen gegenüber Zytostatika umfasst GOF auch die Unterdrückung von Apoptose, eine gesteigerte Angiogenese (Stein et al., 2019) und Veränderungen im Metabolismus wie eine Hochregulation der Glykolyse (Roszkowska et al., 2020), was ein verkürztes Leben für Mäuse und Patienten zur Folge hat (Alexandrova et al., 2017). Zur Ausübung eines GOF-Effekts ist die bereits zuvor beschriebene Akkumulation von MTP53 notwendig. Neben Hsp 90 können auch einige MDM2-Isoformen den MDM2-vermittelten Abbau hemmen (Yue et al., 2017). Außerdem interagieren einige *Bcl-2-associated athanogene* (BAG) Proteine mit MTP53 und verstärken so die Stabilisierung (Yue et al., 2017). Mechanistisch äußert sich GOF in der Veränderung von Genexpressionsmustern. Proapoptotische Gene werden herunter-, Proliferations- und Medikamenten-Resistenz-Gene hingegen hochreguliert (Oren and Rotter, 2010). Außerdem kann MTP53 andere Transkriptionsfaktoren aktivieren oder behindern sowie mit Proteinen interagieren, die keinen Einfluss auf die Genexpression ausüben. Durch die Interaktion von MTP53 mit *Nuclear Factor Y* (NF-Y) wird die Zellzykluskontrolle nach DNA-Schädigungen dereguliert (Muller and Vousden, 2013). Einige mutierte p53-Proteine binden an p63 und p73 und inhibieren diese (Oren and Rotter, 2010), jedoch interagieren unterschiedlich mutierte Proteine nicht gleich mit p63 und p73: p53R175H bindet TAp73 α stärker als p53R273H (Zhang et al., 2019). Ein weiterer Aspekt ist die Aggregation von mutiertem p53. Diese führt außerdem zur Coaggregation von WTP53 sowie p63 und p73, was eine Funktionseinschränkung bedingt (Xu et al., 2011).

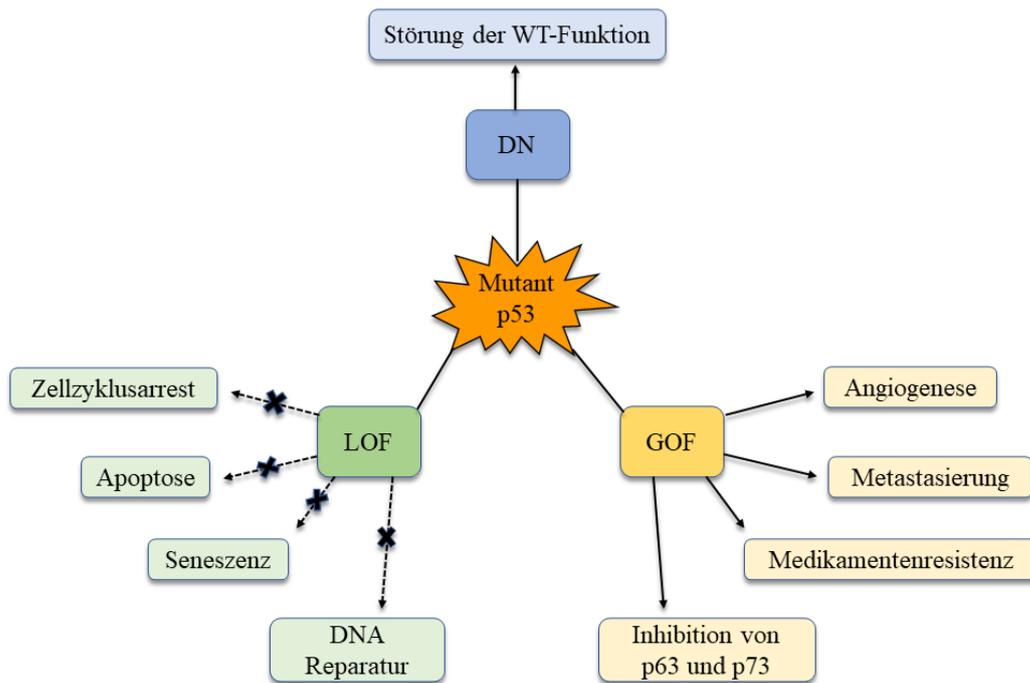


Abbildung 3: Effekte von mutiertem p53
 Basierend auf Brosh and Rotter, 2009

1.2.p53 im Metabolismus

1.2.1. p53 im Glukosestoffwechsel

Der Metabolismus von Tumorzellen muss drei Aufgaben erfüllen: Bereitstellung von Energie in Form von ATP, Versorgung mit Bausteinen für Zellwachstum und -teilung und Eindämmung der Wirkung von *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Cairns et al., 2011). Bereits in den 1920er Jahren stellte Otto Warburg fest, dass Tumorzellen sogar unter aeroben Bedingungen Glykolyse gegenüber oxidativer Phosphorylierung bevorzugen, was schließlich unter dem Namen der aeroben Glykolyse oder dem „Warburg Effekt“ bekannt wurde (Cairns et al., 2011). Die durch den Warburg Effekt ineffektive ATP-Produktion kompensieren Krebszellen wiederum durch eine erhöhte Glukoseaufnahme. Durch die gesteigerte Glykolyse wird die Biosynthese verschiedener Bausteine verbessert. Der veränderte Metabolismus in Tumorzellen zählt außerdem zu den „hallmarks of cancer“ (Hanahan and Weinberg, 2011).

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass p53 eine wichtige Rolle im Metabolismus durch Protein-Protein-Wechselwirkungen, die Steuerung von nachgeschalteten Zielgenen oder indirekt durch Regulierung von Signalwegen einnimmt (Wang and Chao, 2022). Die Wirkungen von p53 variieren je nach Zelltyp und Kontext. In Herzmuskelzellen aktiviert

p53 die Transkription der zwei glykolytischen Enzyme Hexokinase II (HK II) und Phosphoglyceratmutase (PGM) (Maddocks and Vousden, 2011). Andererseits kann p53 die PGM auch hemmen (Lacroix et al., 2020). Auch in hepatozellulären Karzinomen unterstützt p53 die Glykolyse statt der oxidativen Phosphorylierung, indem *p53 Upregulated Modulator of Apoptosis* (PUMA) induziert wird, was die mitochondriale Pyruvat-Aufnahme inhibiert (Kim et al., 2019). In Zervix- und Mammakarzinomzellen unterscheidet sich der Effekt je nach Sauerstoffverfügbarkeit: Unter normoxischen Bedingungen steigert p53 die oxidative Phosphorylierung, während sie unter Hypoxie unterdrückt wird (Wang and Chao, 2022).

Häufig jedoch wirkt p53 dem Warburg Effekt entgegen und damit tumorsuppressiv, z.B. indem die mitochondriale oxidative Phosphorylierung unterstützt wird (Liu et al., 2015). Des Weiteren unterdrückt p53 die Glykolyse auf verschiedenen Wegen wie zum Beispiel der transkriptionellen Hemmung mehrerer glykolytischer Enzyme (Liu et al., 2019). P53 verringert auch die Laktatproduktion aus Pyruvat (Contractor and Harris, 2012).

Während der insulin-sensitive Glukosetransporter GLUT4 in insulin-sensiblen Geweben vorliegt, ist GLUT1 in der Mehrheit der Zellen der am häufigsten vorkommende. Beide Glukosetransporter sind in vielen Krebszellen überexprimiert, was mit einer schlechteren Prognose einhergeht. P53 senkt die Expression beider Transporter, wobei GLUT4 stärker gesenkt wird als GLUT1, und mindert so die Glukoseaufnahme der Zellen (Schwartzberg-Bar-Yoseph et al., 2004). Außerdem führt p53 indirekt zu einer Herunterregulation des Glukosetransporters GLUT3 durch die Inhibition von *Inhibitory kappa B kinase* (IKK), was zu einer verringerten Aktivierung des *Nuclear Factor kappa B* (NF- κ B) und damit auch von GLUT3 führt (Kawauchi et al., 2008).

Des Weiteren greift p53 in die Regulation des Pentosephosphatwegs (PPP) ein. Einerseits wird durch die Induktion von *TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator* (TIGAR) die Glykolyse verringert und damit die Verschiebung in Richtung PPP gefördert (Maddocks and Vousden, 2011). Das ist wichtig, wenn Nukleotide für die DNA-Reparatur oder Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) zur Abwehr von ROS benötigt werden. Andererseits hemmt p53 die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) und damit den ersten Schritt des PPP (Kruiswijk et al., 2015).

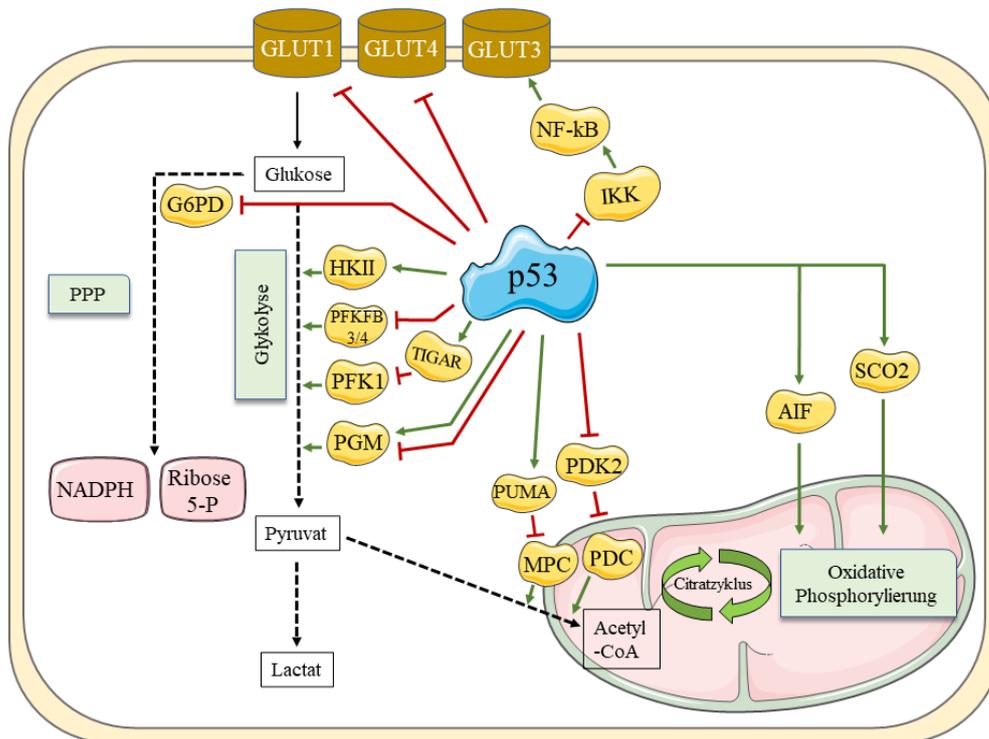


Abbildung 4: p53 im Glukosestoffwechsel

Modifiziert nach Shen et al., 2012, basierend auf Maddocks and Vousden, 2011, Kawauchi et al., 2008, Contractor and Harris, 2012, Liu et al., 2019, Kim et al., 2019. Die Abbildung wurde teilweise mit Servier Medical Art erstellt, bereitgestellt von Servier, lizenziert unter einer Creative Commons Attribution 3.0 (Servier Medical Art, 2022).

P53 nimmt auch eine wichtige Rolle in Nährstoffmangelzuständen ein. Im Glukoseentzug führt p53 *AMP activated protein kinase* (AMPK)-vermittelt zu einem reversiblen Zellzyklusarrest. Nur unter absolutem Glukosemangel beobachteten Jones et al. (2005) Apoptose. Der reversible Zellzyklusarrest erhält die Lebensfähigkeit der Zellen, welche nach Beendigung des Glukoseentzugs erneut proliferieren. In p53-negativen Zellen hingegen ist die Lebensfähigkeit der Zellen durch eine unkontrollierte Zellproliferation im Glukoseentzug reduziert (Jones et al., 2005).

1.2.1.1. MTP53 im Glukosestoffwechsel

Durch die Inaktivierung von p53 in Tumorzellen entfallen die tumorsuppressiven Wirkungen im Glukosestoffwechsel. Eine erhöhte Glukoseaufnahme, eine verstärkte Glykolyse und ein gesteigerter PPP unterstützen den Warburg Effekt und die rasche Bildung von Makromolekülen für die Zellteilung (Jiang et al., 2011). Der Verlust von p53 resultiert in gesteigerter Glykolyse und verbesserter Proliferation (Wang and Chao, 2022). Oft ist es so, dass MTP53 die gleichen Signalwege wie WTP53 beeinflusst, aber

mit konträren Wirkungen. Im Gegensatz zum Wildtyp-Protein können p53-Proteine mit den Mutationen R175H, R273H und G279E die G6PD nicht inhibieren (Jiang et al., 2011). Die Glykolyse wird aber beispielsweise von MTP53 durch verschiedene Mechanismen gefördert (Liu et al., 2015) und die mitochondriale Atmung unterdrückt (Eriksson et al., 2017). Das sind Aspekte des GOF, die zur Tumorentstehung beitragen. Je nach Mutation kann die Wirkung jedoch unterschiedlich aussehen. Für die R175H, R273Q und R273H Mutationen wurde eine gesteigerte Glykolyse nachgewiesen (Zhang et al., 2013), nicht jedoch für H179R und D2812G (Eriksson et al., 2017). Die Aktivierung des RhoA/ROCK Signalwegs durch MTP53 führt zwar nicht zur vermehrten Expression von GLUT1 (Schwartzberg-Bar-Yoseph et al., 2004; Zhang et al., 2013), jedoch wird es verstärkt in die Plasmamembran transloziert und so die Glukoseaufnahme gesteigert (Wang and Chao, 2022). Außerdem wurde in Zellen mit MTP53 nachgewiesen, dass der Glukosetransporter GLUT4 vermehrt exprimiert wird (Chavez-Perez et al., 2011). Neben einem erhöhten Glukosetransport regt MTP53 auch die Expression (Liu et al., 2015) und Aktivierung glykolytischer Enzyme an (Liu et al., 2019). Ein weiterer Aspekt, der zum GOF von MTP53 in Bezug auf Metabolismus und damit z.B. zu invasivem Wachstum beiträgt, ist die Inhibition von AMPK. Aufgrund der Fähigkeit, in metabolischen Stresssituationen zur Unterdrückung des Zellwachstums zu führen, gilt AMPK als Tumorsuppressor. Durch Glukoseentzug wird eine Inhibition der AMPK-Aktivierung durch die Mutationen P151S, R175H, G245C und R282W hervorgerufen (Zhou et al., 2014).

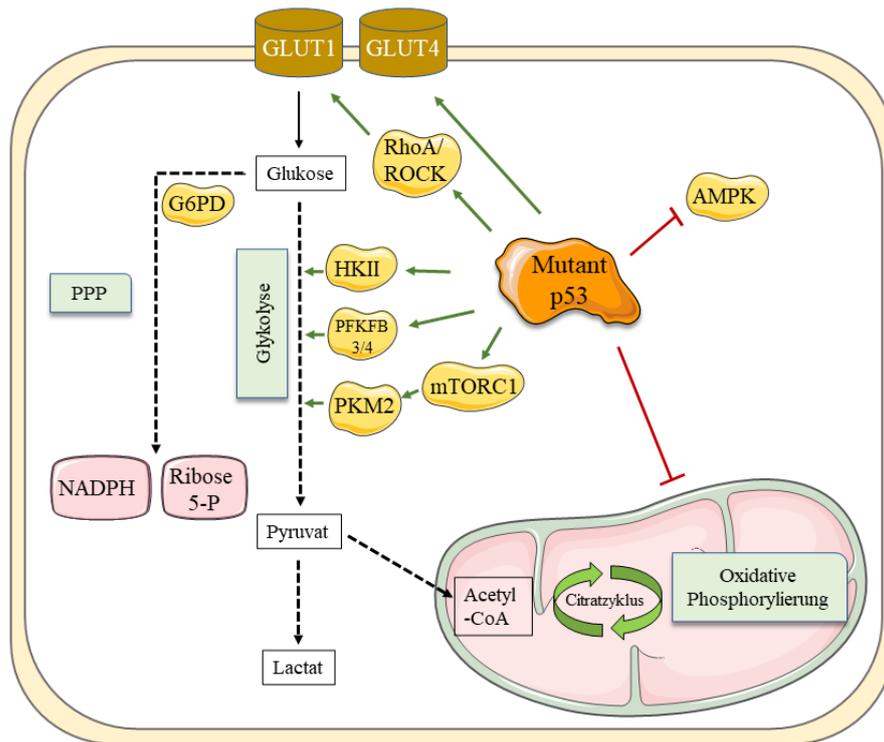


Abbildung 5: Mtp53 im Glukosestoffwechsel

Basierend auf Chavez-Perez et al., 2011, Wang and Chao, 2022, Eriksson et al., 2017, Zhang et al., 2013, Zhou et al., 2014. Die Abbildung wurde teilweise mit Servier Medical Art erstellt, bereitgestellt von Servier, lizenziert unter einer Creative Commons Attribution 3.0 (Servier Medical Art, 2022).

1.2.2. p53 im Glutaminstoffwechsel

Neben dem Glukosestoffwechsel ist der Glutaminstoffwechsel von großer Bedeutung für das Überleben und Wachstum der Tumorzelle. Obwohl der menschliche Körper Glutamin als nicht-essenzielle Aminosäure selbst synthetisieren kann, sind viele Tumorzellen auf die exogene Zufuhr zum Überleben angewiesen. Dieses Phänomen wird auch „Glutaminabhängigkeit“ („glutamine addiction“) genannt (Li et al., 2021). Jedoch trifft das nicht auf alle Tumorarten und -gewebe gleichermaßen zu: Östrogenrezeptor-positive Mammakarzinonmzellen sind z.B. weniger abhängig von Glutamin als triple-negative (Altman et al., 2016).

Glutamin ist die am häufigsten vorkommende Aminosäure im menschlichen Körper. Sie dient als Baustein für viele andere Aminosäuren, Proteine und Nukleotide (Chen and Cui, 2015).

Glutamin ist außerdem wichtig zur Herstellung von Glutathion, einem Tripeptid bestehend aus Glutamat, Cystein und Glycin. Es ist wichtig zur Abwehr von oxidativem Stress. Glutamin wird einerseits zur Herstellung von Glutamat selbst und andererseits zur

Herstellung einer ausreichenden Menge Glutamat für den Glutamat-Cystin Transporter verwendet (DeBerardinis and Cheng, 2010).

P53 greift in den Glutaminstoffwechsel ein durch die Induktion der Expression der GLS2, einer Glutaminase im Mitochondrion, welche die Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat katalysiert. Glutamat kann durch die Verstoffwechselung zu α -Ketoglutarat, ein Substrat des Citratzyklus, zur Energiegewinnung genutzt werden. Es gibt zwei Isoformen der Glutaminase, die sich im Expressionsmuster in verschiedenen Geweben unterscheiden. Der Nierentyp GLS1 wird häufig im normalen Gewebe, der Lebertyp GLS2 wird in der Leber, im Gehirn, der Hypophyse und im Pankreas exprimiert (Li et al., 2021). Während die GLS1 in vielen Tumoren stark exprimiert wird und so zur Tumorpheriferation beiträgt, ist die GLS2 Expression vermindert (Chen and Cui, 2015). Des Weiteren unterscheiden sich die beiden Isoformen durch eine unterschiedliche Kinetik und Regulation, beispielsweise hat p53 keinen Einfluss auf die GLS1 (Hu et al., 2010).

In verschiedenen Tumormodellen wurde gezeigt, dass Glutamin im Zentrum der Tumormasse depletiert ist und Tumore Prozesse entwickeln, um temporäre Nährstoffmangelzustände zu überleben bis sie besser vaskularisiert sind (Ishak Gabra et al., 2018).

P53 trägt zum Überleben unter Glutaminmangel bei, indem verschiedene Transporter durch p53 hochreguliert werden. Am stärksten wird der SLC7A3, ein Arginin-Transporter, hochreguliert. Arginin fördert die Aktivierung von *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1) zur Unterstützung des Zellwachstums (Lowman et al., 2019). Außerdem wird der SLC1A3, ein Aspartat-Glutamat-Transporter, von p53 hochreguliert. Viele Zelllinien exprimieren SLC1A3 nur schwach (A2780, A549, U2OS, OVCAR-5, RT4, SiHa, and A375), während andere eine starke Expression aufweisen (MDA-MB-468, OVCAR-4, and IGROV1). Das Zellwachstum unter Glutaminentzug korreliert mit der Expression von SLC1A3, welche dadurch auch induziert wird (Tajan et al., 2018). Unter Glutaminmangel können p53-positive Zellen Aspartat und Alanin zur *de-novo*-Synthese von Glutamin nutzen, was p53-negative Zellen schlechter können (Tajan et al., 2018).

P53-Mutationen haben unterschiedliche Auswirkungen unter Glutaminentzug zur Folge. Während HCT116-Zellen mit p53R248W-Mutationen in der Lage sind, p21 und SLC1A3 hoch zu regulieren, können die gleichen Zellen mit einer R175H-Mutation dies nicht, was

sich auch in einem gestörten Zellwachstum widerspiegelt (Tajan et al., 2018). Die Induktion von p21 führt zu einem transienten G1/S-Phasen-Zellzyklusarrest, der das Überleben in Glutaminmangelsituationen sichert. Im Gegensatz zu Wtp53-Zellen werden durch Mtp53-Proteine (R248Q und R273H) keine apoptotischen Zielgene aktiviert, sondern zellzyklusarretierende und metabolische Zielgene wie CDKN1A, GLS2, GADD45A und TIGAR. Außerdem sind Zellen mit Mtp53 weniger empfindlich gegenüber Glutaminentzug, was zu einem Überlebensvorteil gegenüber Wtp53- und p53-negativen Zellen führt, da aufgrund der anfänglich schlechten Vaskularisation die Versorgung von Tumorzellen mit Glutamin schlecht ist (Tran et al., 2017).

1.3.p73

1.3.1. Struktur und Funktion von p73

p73 wurde 1997 entdeckt und ist in Neuroblastomen häufig deletiert (Horvat et al., 2021). Die strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zum Tumorsuppressor p53 sowie p63 führte zu der Bezeichnung „p53-Familie“. Als Transkriptionsfaktor erfüllt p73 neben der Möglichkeit zur Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose auch Funktionen in der Neurogenese, sensorischen Signalwegen und Homöostase (Horvat et al., 2021). Die funktionelle Ähnlichkeit von p73 zu p53 besteht in der Regulation von ähnlichen Zielgenen in Bezug auf Zellzyklusarrest wie p21 (Gaiddon et al., 2001) und in Bezug auf Apoptose z.B. PUMA und *Bax* und *GRAMD4* (Yoon et al., 2015).

Es gibt mehr als zehn Varianten des p73-Proteins. Durch die Transkription von zwei verschiedenen Promotoren entstehen *transcriptionally active* (TA)p73 und Δ N-TAD-verkürzte Isoformen (Vikhreva et al., 2018). Die TA-Isoformen sind proapoptotisch und die Δ N-Isoformen wirken durch die Inhibition von TAp73 und Wtp53 antiapoptotisch (Yoon et al., 2015). Zudem führt alternatives Splicing am C-Terminus zur Entstehung mehrerer gespleißter Varianten wie α , β , γ , δ , ϵ , ζ und η (Vikhreva et al., 2018). Knockout-Modelle haben gezeigt, dass die Entfernung von TAp73 die Entstehung von Krebs begünstigt und die Entfernung von Δ Np73 Tumorwachstum hemmt (Tomasini et al., 2008; Wilhelm et al., 2010). In gesunden Zellen ist das Expressionsniveau von p73 niedrig (Ozaki and Nakagawara, 2005), da p73 normalerweise abgebaut wird (Yoon et al., 2015). Genotoxischer Stress wie DNA-Schädigungen führt durch posttranslationale Modifikationen zur Akkumulation von TAp73. Durch gezielten Abbau von Δ Np73 wird

das TA/ Δ N Verhältnis erhöht und Apoptose kann stattfinden (Yoon et al., 2015). Im Gegensatz zu p53 ist p73 in Tumoren selten mutiert, jedoch ist die Expression oft dereguliert (Rufini et al., 2011). Eine Überexpression von TAp73 α , TAp73 β and TAp73 γ induziert Apoptose und TAp73 β aktiviert die Transkription apoptotischer Zielgene am stärksten (Vikhreva et al., 2018). Dass in vielen Tumoren p73 überexprimiert wird, könnte damit zusammenhängen, dass MTP53 p73 inhibiert (Gaiddon et al., 2001).

1.3.2. Interaktion von MTP53 mit p73

1999 zeigten Di Como et al., dass p73 α mit p53R248W and p53R175H interagiert, jedoch nicht mit WTp53. Durch Expression der Mutanten wird die Induktion von Apoptose (Di Como et al., 1999) und Zellzyklusarrest durch p73 gehemmt (Strano et al., 2000). Mutationen in der DBD von p53 können die Konformation des Proteins so verändern, dass eine Interaktion mit p73 möglich ist, welche die transkriptionale Aktivität der Proteine behindert (Stindt et al., 2015). Xu et al. (2011) zeigten, dass ein Mechanismus darin besteht, dass MTP53 eine verstärkte Aggregation sowie auch Co-Aggregation von p73 aufweist. Die Konformationsmutante p53R175H bindet TAp73 stärker als die DNA-Kontaktmutante p53R273H (Stindt et al., 2015) und es wurde nachgewiesen, dass die Bindungskapazität von MTP53 und p73 mit der Resistenz der Tumorzellen gegenüber Zytostatika korreliert (Li and Prives, 2007). Neben Chemotherapieresistenz spielt die Inhibition von p73 durch mutiertes p53 auch eine Rolle bei der Invasivität und Metastasierung von Tumoren. Weissmueller et al. (2014) zeigten, dass sowohl p53R175H als auch p53R273H die Metastasierung von Pankreaskarzinomen durch eine Veränderung von p73 und dessen Interaktion mit NF- κ B begünstigt, auch wenn die Bindung von p53R273H und p73 schwächer ist (Weissmueller et al., 2014).

Für TAp73 β wurde einerseits gezeigt, dass es mit p53R175H interagiert (Strano et al., 2000, Gaiddon et al., 2001) und andererseits, dass der verkürzten TAp73 β -Isoform die Aminosäuren für die Bindung von p53R175H fehlen (Stindt et al., 2015, Vikhreva et al., 2018).

Die Struktur des mutierten Proteins ist aber nicht der einzige Einfluss nehmende Faktor. Ein p53-Polymorphismus am Codon 72 kann die Bindungsaffinität mit p73 beeinflussen. Codon 72 kodiert entweder für Arginin (R) oder Prolin (P). Wenn Mutationen in der 72R statt der 72P Variante auftreten, wird die transkriptionelle Aktivität von p73 stärker unterdrückt und das Überleben der Patienten verschlechtert sich (Rufini et al., 2011). Dass die Bindung der Mutante ebenfalls nicht allein für die Inhibition von p73 entscheidend

ist, wird dadurch unterstützt, dass MDM2 die Interaktion von p53^{273H} mit TAp73 α verbessern kann (Stindt et al., 2015).

1.4. Personalisierte Medizin

Das U.S. National Cancer Institute definiert personalisierte Medizin als „eine Form der Medizin, die Informationen über die Gene oder Proteine einer Person nutzt, um Krankheit vorzubeugen, zu diagnostizieren oder zu behandeln“ („A form of medicine that uses information about a person’s own genes or proteins to prevent, diagnose, or treat disease.“ National Cancer Institute, 2022).

Krebs ist eine heterogene Erkrankung, bei der innerhalb verschiedener Tumorentitäten große Unterschiede zwischen den Ursachen, der Pathogenese oder dem Therapieerfolg liegen. Sogar zwischen Individuen mit dem gleichen Tumor bestehen große Variationen, was auf genetische Faktoren zurückzuführen ist. Diese Unterschiede machen Krebs zu einem attraktiven Ziel der personalisierten Medizin. Eine Zielsetzung liegt darin, Patienten in Subgruppen mit spezifischen molekularen Eigenschaften zu stratifizieren, sodass eine zielgerichtete Therapie eingesetzt werden kann, die den größtmöglichen Nutzen bei gleichzeitig geringstmöglichen Nebenwirkungen bietet (Diamandis et al., 2010).

In der Vergangenheit konnten bereits einige Erfolge in der personalisierten Medizin erzielt werden. Ein Beispiel stellt die Chronische Myeloische Leukämie dar. Sie ist sehr häufig mit einer spezifischen chromosomalen Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22, dem sog. Philadelphia-Chromosom, assoziiert. Diese Translokation führt zu der Entstehung des Fusionsgens *Bcr-Abl* (Druker et al., 1996). Das entstandene Fusionsprotein ist eine Tyrosinkinase mit unkontrollierter Aktivität, was die maligne Transformation begünstigt (Deininger et al., 1997; Stindt et al., 2015). Mit CGP 57148, auch bekannt als Imatinib, wurde ein Inhibitor dieser Tyrosinkinase entdeckt, der gezielt die Proliferation der Bcr-Abl-positiven Zellen *in vitro* und *in vivo* inhibiert (Druker et al., 1996). So konnte das mediane Gesamtüberleben nach der Diagnose von vier bis sechs Jahren (Pasternak et al., 1998) durch die Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren bis zu einer normalen Lebenserwartung angehoben werden (Hehlmann, 2020).

Eine weitere Erfolgsgeschichte ist der monoklonale HER2-Antikörper Trastuzumab. Das HER2-Gen, was für den HER2-Rezeptor kodiert, ist in 25 – 30 % aller Mammakarzinome amplifiziert (Slamon et al., 2001). HER2 gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren der Tyrosinkinase (Nahta and Esteva, 2007). Durch die Ergänzung von Trastuzumab zur Chemotherapie konnte ein längeres Gesamtüberleben und eine Reduktion des Risikos zu versterben von 20 % erreicht werden (Slamon et al., 2001).

1.4.1. p53 als pharmakologisches Ziel

In Tumoren ohne *TP53*-Mutation wird p53 häufig durch MDM2-Hochregulation verstärkt abgebaut. Um dem entgegenzuwirken und funktionelles p53 zu reaktivieren, wurden kleine Moleküle entwickelt, die die Bindung zwischen p53 und MDM2 verhindern (Shangary and Wang, 2009). Nutlin, ein *cis*-Imidazolin-Analogon, war einer der ersten potenten MDM2-Inhibitoren, für den nachgewiesen wurde, dass p53 vermindert abgebaut und durch die Akkumulation dosisabhängig p21 verstärkt exprimiert wird. Dadurch wurde auch das Tumorstadium inhibiert (Vassilev et al., 2004). Die Entwicklung weiterer MDM2-Inhibitoren folgte und RG7112 war der erste, der in klinischen Studien getestet wurde (Konopleva et al., 2020). Inzwischen werden auch viele weitere wie Idasanutlin (NCT04029688), AMG-232 (NCT03031730), APG-115 (NCT03611868), Milademetan (NCT05012397) und Siremadlin (NCT05155709) klinisch untersucht und in Kombinationstherapien erprobt, um die Effektivität zu erhöhen (Konopleva et al., 2020).

Dass p53 in so vielen Tumoren mutiert vorliegt und mit einem *gain of function* zur Tumorausbreitung und Metastasierung beiträgt, macht es zu einem attraktiven pharmakologischen Ziel. Die bisherigen Strategien zur Behandlung von Tumoren mit MTP53 bedingen die Wiederherstellung der WTp53-Konformation und -Funktion oder die Beseitigung von MTP53 (Hu et al., 2021). APR-246 beispielsweise ist eine Verbindung, die die Konformation von MTP53 so verändern soll, dass die DNA-Bindung von p53-Zielgenen wieder ermöglicht wird, um so die Funktion von p53 wiederherzustellen und Apoptose induzieren zu können (Bykov et al., 2018). Es wird in klinischen Phase I und II Studien bereits eingesetzt (NCT03931291, NCT04214860, NCT03268382). Eine Verbindung, die die Akkumulation, welche zur GOF-Wirkung von MTP53 notwendig ist, verhindern soll, ist der HSP90-Inhibitor Ganestespib. Im *in vivo*-Modell profitierten MTP53-Mäuse von der Behandlung mit einem längeren

Gesamtüberleben im Gegensatz zu p53-negativen Mäusen (Alexandrova et al., 2015). Außerdem werden Substanzen untersucht, die die Inhibition von p73 durch Mtp53 aufheben. RETRA wurde als einer der ersten p73-Aktivatoren entdeckt (Kravchenko et al., 2008). NSC5998 und Prodigiosin verhindern ebenfalls die Interaktion von Mtp53 und p73 (Cai et al., 2022). Als effektiver hinsichtlich Unterdrückung der Zellproliferation erwies sich die Kombination aus einem p73-Aktivator wie RETRA oder NSC5998 mit einem Nicotinamid Phosphoribosyltransferase (NAMPT)-Inhibitor, welcher die Aggregation von Mtp53 behindert (Cai et al., 2022). Bisher gibt es jedoch keine zugelassene Therapie speziell für Tumore mit mutiertem p53, weshalb es notwendig ist, weitere Angriffsziele für verschiedene p53-Mutationen zu erforschen.

1.5.Zielsetzung der Arbeit

Phänotypische Unterschiede in der Wirkung des GOF beruhen nicht nur auf dem Ort der Mutation, sondern auch auf der dort eingebauten Aminosäure (Roszkowska et al., 2020). Das Codon R175 gehört zu den Hotspots der p53-Mutationen (Chiang et al., 2021), bei denen sich unterschiedliche Auswirkungen je nach substituierter Aminosäure ergeben (Kotler et al., 2018). Das macht eine nähere Charakterisierung und Untersuchung der verschiedenen Mutationen notwendig.

Bereits 2003 führten Kato et al. eine strukturierte Analyse hinsichtlich der transkriptionellen Aktivität von 2.314 p53-Mutationen in Hefezellen durch, was jedoch ein sehr artifizielles System darstellt. Kotler et al. (2018) untersuchten 9.833 lentiviral in H1299-NSCLC-Zellen eingebrachte Mutationen. Aufgrund der Verwendung von menschlichen Lungentumorzellen ist es aus translationaler Sicht ein besseres Modell. In diesem System ist jedoch nicht klar, wie das restliche p53-Netzwerk aussieht, da diese Lungentumorzellen zuvor p53-negativ waren.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, in einem adäquaten physiologischen System die Auswirkungen von $TP53^{R175}$ -Mutationen auf die Proteinfunktion, besonders zwei Aspekte des GOF, zu untersuchen.

Verwendet wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie HCT116 $TP53^{WT}$, welche mittels *CRISPR/Cas9* genetisch modifiziert worden war, sodass in dem einen Allel eine große Deletion im Intron 5 vorlag. Mittels *CRISPR/Cas9* wurde die Zelllinie so verändert, dass

am Codon 175 von *TP53* eine Mutationslibrary aller denkbaren R175-Mutationen durch Rekombination eingesetzt werden konnte (s. Abbildung 6). Auf diese Weise konnten viele p53-Mutationen parallel in physiologischen genetischen Kontext des endogenen *TP53*-Gens verglichen werden.

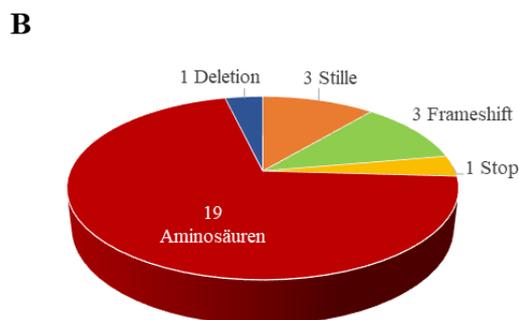
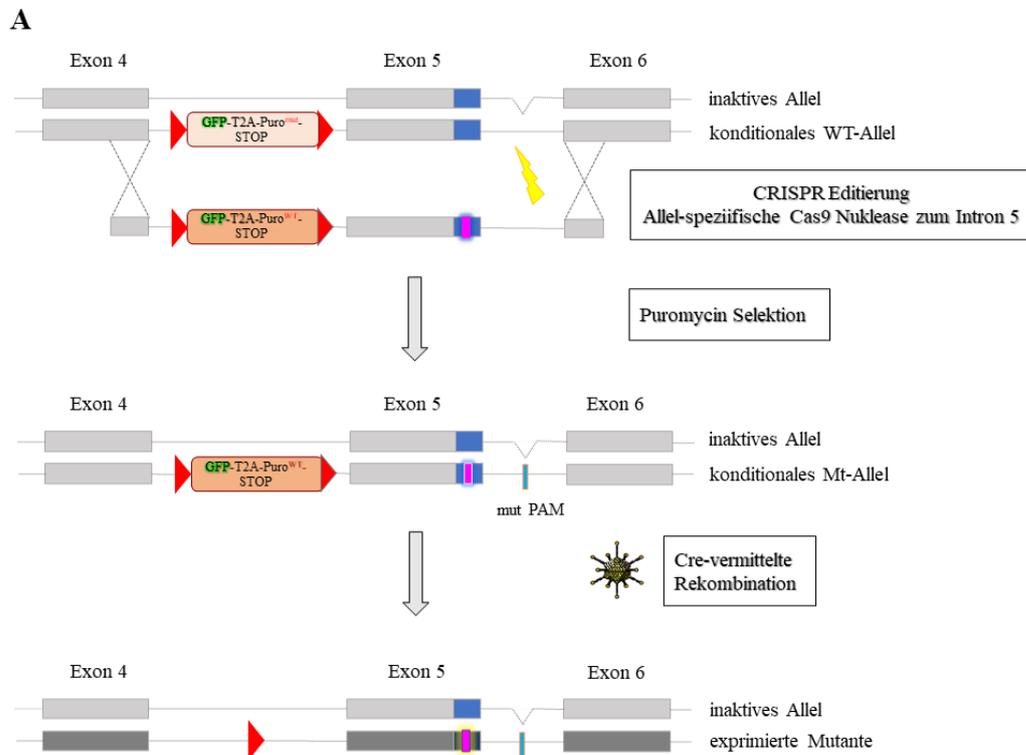


Abbildung 6: CRISPR Editierung der *TP53R175*-Mutationslibrary

(A) CRISPR Editierung, modifiziert nach freundlicherweise zur Verfügung gestellter Vorlage von Maria Klimovich. (B) Kreisdiagramm der *TP53R175*-Mutationslibrary.

Um die verschiedenen p53R175-Mutationen näher hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Proteinfunktion zu untersuchen, wurden verschiedene Experimente durchgeführt, die auf einen LOF bzw. GOF hindeuten können. Zur Validierung des Systems wurde eine Behandlung mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin durchgeführt. Durch die Bindung von MDM2 wird die Interaktion mit p53 gestört und so Stress imitiert, der zur Stabilisierung

von p53 führt, was Zellzyklusarrest und Apoptose zur Folge hat (Vassilev et al., 2004). Nach Isolierung der gDNA sowie Durchführung der Nested PCR und Sequenzierung sollte sich zeigen, dass die Zellen mit stillen p53-Mutationen depletiert und Zellen mit Mutationen, die zu einem Proteinfunktionsverlust führen, angereichert waren (s. Abbildung 7A).

Zur näheren Klassifizierung eines GOF-Effekts von p53R175-Mutationen wurden zwei mögliche Mechanismen untersucht. Der erste Teil betraf Auswirkungen im Metabolismus. Die HCT116 *TP53^{Δ/R175-Library}*-Zellen wurden verschiedenen Nährstoffmangelzuständen ausgesetzt, um herauszufinden, ob bestimmte p53R175-Mutationen einen Überlebensvorteil unter Nährstoffmangel bedingen, der zur Anreicherung dieser Zellen führt. Der zweite Teil betraf die Inhibition von p73. In den HCT116 *TP53^{Δ/R175-Library}*-Zellen wurde p73 überexprimiert, um zu untersuchen, ob einige Mutationen zur Unterdrückung von p73 durch MTP53 führen und sich infolgedessen anreichern (s. Abbildung 7B).

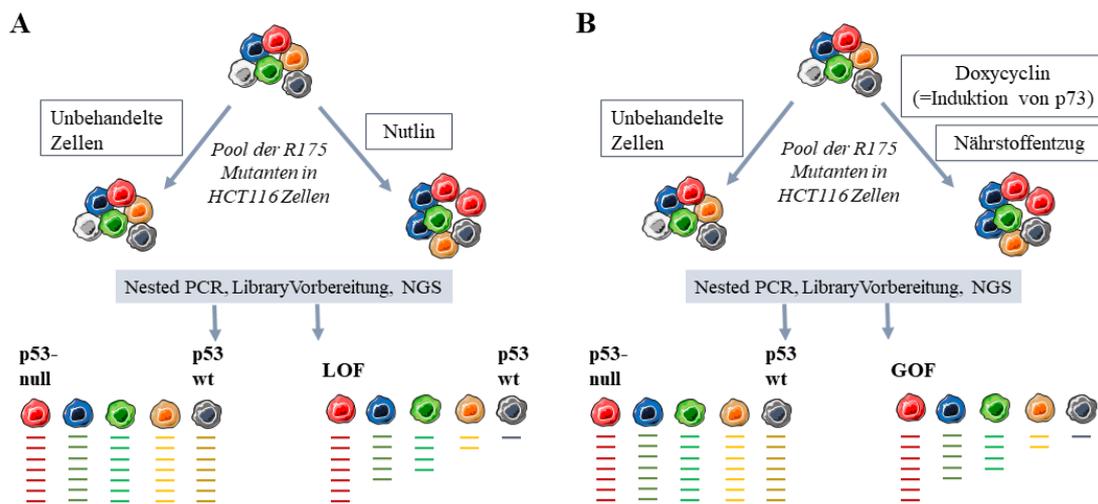


Abbildung 7: Vorgehensweise zur Untersuchung der Auswirkungen der Mutationen auf die Proteinfunktion

(A) Vorgehensweise zur Analyse eines LOF-Effekts der p53R175-Mutationen. (B) Vorgehensweise zur Analyse eines möglichen GOF-Mechanismus der p53R175-Mutationen; modifiziert nach freundlicherweise zur Verfügung gestellter Vorlage von Maria Klimovich.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien und Bakterienstämme

Tabelle 1: Zelllinien

| Zelllinie | Beschreibung | Referenz |
|---|-----------------------------------|--------------------------------|
| HCT116 <i>TP53^{Δ/LSL}</i> | Humane Kolonkarzinomzellen | AG Stiewe (Maria Klimovich) |
| HCT116 <i>TP53^{Δ/LSL-R175-Library}</i> | Humane Kolonkarzinomzellen | AG Stiewe (Maria Klimovich) |
| HCT116 <i>TP53^{Δ/R175-Library}</i> | Humane Kolonkarzinomzellen | AG Stiewe (diese Arbeit) |
| HCT116 <i>TP53^{Δ/LSL} TAp73α</i> | Humane Kolonkarzinomzellen | AG Stiewe (diese Arbeit) |
| HCT116 <i>TP53^{Δ/LSL} TAp73β</i> | Humane Kolonkarzinomzellen | AG Stiewe (diese Arbeit) |
| HCT116 <i>TP53^{Δ/LSL-R175-Library}</i> TAp73α | Humane Kolonkarzinomzellen | AG Stiewe (diese Arbeit) |
| HCT116 <i>TP53^{Δ/LSL-R175-Library}</i> TAp73β | Humane Kolonkarzinomzellen | AG Stiewe (diese Arbeit) |
| HCT116 <i>TP53^{Δ/R175-Library}</i> TAp73α | Humane Kolonkarzinomzellen | AG Stiewe (diese Arbeit) |
| HCT116 <i>TP53^{Δ/R175-Library}</i> TAp73β | Humane Kolonkarzinomzellen | AG Stiewe (diese Arbeit) |
| HEK 293-T | Humane embryonale Nierenzellen | AG Stiewe |

Tabelle 2: Bakterienstämme

| Bakterienstamm | Beschreibung | Referenz |
|------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| ElectroMAX™ DH10B™ Zellen | Elektrokompetente Escherichia coli | Thermo Fisher Scientific |

2.1.2. Plasmide

Tabelle 3: Plasmide

| # | Name | Referenz |
|------------------|---------------------------|----------------------------------|
| 748 | psPAX2 | Addgene #12260 (Didier Trono) |
| 749 | pMD2.G | Addgene #12259 (Didier Trono) |
| 4364 | pInducer20-TAp73 α | AG Stiewe (Andrea Nist) |
| 4365 | pInducer20-TAp73 β | AG Stiewe (Andrea Nist) |
| 3332 (alt: F033) | HR700_R175_mutant_library | AG Stiewe (Maria Klimovich) |
| 3330 | Px330sgRNA_in5_p53+T | AG Stiewe (Maria Klimovich) |

2.1.3. Oligonukleotide

Tabelle 4: Oligonukleotide

| # | Name | Sequenz (5'-3') |
|-------|-------------------------|--|
| 736 | TP53-Ex5_for | GGGTTGCAGGAGGTGCTTAC |
| 6535 | T7 Assay hp53_2 rev | GATGGTGGTACAGTCAGAGCC |
| 9624 | TP53_ex5_NGS_BC1 1_r | AGAACCAGAAGACTTGCCAACTGGCCAA GACCT |
| 10255 | #P53Int4-for1 | CCCTTTGGCTTCCTGTCAGTG |
| 10540 | TP53_mutPAM_f_BC O1 | CGTACAAGAGACAAGCAATCAGTGAGGA ATCAGAGGCCTCC |
| 10541 | TP53_mutPAM_f_BC O3 | CGTACTAGCAGACAGCAATCAGTGAGGA ATCAGAGGCCTCC |
| 10542 | TP53_mutPAM_f_BC O5 | TCTTGAGTATCTGTAGCAATCAGTGAGGA ATCAGAGGCCTCC |

2.1.4. Antikörper

Tabelle 5: Primärantikörper

| Name | Antigen | Spezies | Verdünnung | Hersteller |
|--------|---------|---------|------------|----------------|
| 3D4 | BRDU | mouse | 1:20 | BD Pharmingen™ |
| AC-15 | β-Actin | mouse | 1:10.000 | Abcam |
| EP436Y | p73 | rabbit | 1:500 | Abcam |

Tabelle 6: Sekundärantikörper

| Name | Spezies | Verdünnung | Hersteller |
|-------------------------------|---------------|------------|-----------------------|
| Anti-Mouse IgG HRP linked | <i>sheep</i> | 1:2500 | Merck KGaA (NA931) |
| Anti-Rabbit IgG HRP Linked | <i>donkey</i> | 1:5000 | Merck KGaA (NA934) |

2.1.5. Viren

Tabelle 7: Viren

| Name | Beschreibung | Referenz |
|---------------------------|--------------|--------------------------|
| VQ Ad Cre | Retrovirus | ViraQuest Inc |
| pInducer20-TAp73 α | Lentivirus | AG Stiewe (diese Arbeit) |
| pInducer20-TAp73 β | Lentivirus | AG Stiewe (diese Arbeit) |

2.1.6. Enzyme

Tabelle 8: Enzyme

| Name | Hersteller | Cat No. |
|-----------------------------------|----------------|------------|
| GoTaq® G2 DNA Polymerase | Promega | M7848 |
| Proteinase K- Lösung | AppliChem GmbH | A4392,0010 |
| RNase A (DNase-frei) | AppliChem GmbH | A3832 |

2.1.7. Sequenzen und Bezeichnungen der R175-Library

Tabelle 9 Sequenzen und Bezeichnungen der R175-Library

| Abkürzung | Bezeichnung | Sequenz an Stelle des R-Codons CGC |
|------------------|--------------------|---|
| A | Alanin | GCC |
| C | Cystein | TGC |
| D | Asparaginsäure | GAC |
| Del | Deletion | TGC |
| E | Glutaminsäure | GAG |
| F | Phenylalanin | TTC |
| FS-1 | Frameshift -1bp | GC |
| FS-2 | Frameshift -2bp | G |
| FS+1 | Frameshift +1bp | CCGC |
| G | Glycin | GGC |
| H | Histidin | CAC |
| I | Isoleucin | ATC |
| K | Lysin | AAG |
| L | Leucin | CTG |
| M | Methionin | ATG |
| N | Asparagin | AAC |
| P | Prolin | CCC |
| Q | Glutamin | CAG |
| R1 | Synonym/still 1 | CGA |
| R2 | Synonym/still 2 | CGG |
| R3 | Synonym/still 3 | CGT |
| S | Serin | AGC |
| Stop | Stop | TGA |
| T | Threonin | ACC |
| V | Valin | GTG |
| W | Tryptophan | TGG |
| Y | Tyrosin | TAC |

2.1.8. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 10: Chemikalien und Reagenzien

| Name | Hersteller | Cat No. |
|---|--|----------------|
| 2-Deoxyglucose | Sigma-Aldrich (Merck KGaA) | D8375-5G |
| 2-Propanol (Isopropanol) | Carl Roth GmbH | 6752.4 |
| 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) | Sigma-Aldrich (Merck KGaA) | B9285 |
| Agarose NEEO Ultra-Qualität | Carl Roth GmbH + Co. KG | 2267.4 |
| Aqua ad injectabilia | Apotheke UKGM | 1108 |
| Bovine Serum Albumin | Sigma-Aldrich (Merck KGaA) | A7906 |
| Bradford Reagenz | Bio-Rad | 500-0006 |
| Calciumchlorid Dihydrat | Carl Roth GmbH + Co. KG | 5239.1 |
| Colorless GoTaq® Reaction Buffer | Promega GmbH | M792A |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Carl Roth GmbH + Co. KG | 4720.1 |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | Carl Roth GmbH + Co. KG | P030.1 |
| di-Natriumtetraborat-Decahydrat (Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O) | Merck KGaA | 1.06308.0500 |
| dNTP Set, 100 mM Solutions | Thermo Fisher Scientific | R0182 |
| EDTA (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈) | Carl Roth GmbH + Co. KG | 8043.2 |
| Essigsäure | Carl Roth GmbH + Co. KG | 3738.2 |
| Ethanol | Carl Roth GmbH + Co. KG | 9065.4 |
| Hefeextrakt | Carl Roth GmbH + Co. KG | 2363.2 |
| HEPES für Pufferlösungen | AppliChem GmbH | A1069 |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merck KGaA | 1.04936.1000 |
| Kaliumdihydrogenphosphat | AppliChem GmbH | A3620.1000 |
| Kristallviolettlösung | Sigma-Aldrich (Merck KGaA) | HT90132 |
| Lipofectamine™ 2000 Transfektionsreagenz | Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific) | 11668-019 |
| Magermilchpulver | AppliChem GmbH | A0830.0500 |
| Methanol | Carl Roth GmbH + Co. KG | 4627.5 |
| Natriumchlorid (NaCl) | Carl Roth GmbH + Co. KG | 3957.2 |

| | | |
|--|---|----------------------|
| Novex™ NuPAGE™ Transferpuffer (20x) | Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific) | NP0006 |
| NP-40 alternative | Sigma-Aldrich (Merck KGaA) | 492016 |
| NuPAGE MES SDS Running Buffer (20X) | Life Technologies | Life Technologies |
| NuPAGE™ LDS-Probenpuffer (4x) | Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific) | NP0007 |
| NuPAGE™ Probenreduktionsmittel (10x) | Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific) | NP0009 |
| Nutlin-3a | BOC Sciences | 675576-98-4 |
| PageRuler™ Prestained Protein Ladder | Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific) | 26617 |
| Polybren | Sigma-Aldrich (Merck KGaA) | 107689 |
| Propidiumiodid | Sigma-Aldrich (Merck KGaA) | P4864 |
| QX DNA Dilution Buffer | Qiagen | 929601 |
| Salzsäure (HCl) | Carl Roth GmbH + Co. KG | 4625.2 |
| Standard Taq (Mg-free) Reaction Buffer Pack | NEB | B9015S |
| Tris | Carl Roth GmbH + Co. KG | 4855.3 |
| Triton X-100 | AppliChem GmbH | A1388.0500 |
| Trypsin-EDTA Lösung | Sigma-Aldrich (Merck KGaA) | T4174 |
| Trypton | Carl Roth GmbH + Co. KG | 8952.2 |
| Tween 20 | AppliChem GmbH | A4974.0500 |
| Wasser ROTISOLV® | Carl Roth GmbH + Co. KG | A511.2 |

2.1.9. Puffer und Lösungen

Tabelle 11: Puffer und Lösungen

| Name | Zusammensetzung |
|--------------------|---|
| 1x PBS (pH= 6,5-7) | 2,7 mM KCL 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 137,9 mM NaCl 8,16 mM Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei) |

| | |
|-----------------------------|---|
| 1x TBST | 5 mM Tris 15 mM NaCl 0,1 % Tween 20 |
| 2x HBS (pH= 7,05) | 5 M NaCl 1 M Na ₂ HPO ₄ 1 M HEPES |
| 50x TAE | 2 M Tris 5,7 % Essigsäure 50 mM EDTA (pH= 8) |
| Agarplatte | 1,5 % Agar-Agar in LB-Medium |
| Blockmilch | 5 % Magermilchpulver in 1x TBST |
| Einfriermedium | 65 % DMEM 25 % FCS 10 % DMSO |
| Kristallviolett | 3 % Kristallviolettlösung 20 % Ethanol |
| LB-Medium (pH= 7,5) | 5 g/l NaCl 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Trypton |
| NP 40 Lysepuffer | 50 mM Tris HCl (pH = 7.4) 150 mM NaCl 5 mM EDTA (pH = 8.0) 2 % Nonidet P40 alternative |
| Western Blot Transferpuffer | 100 ml Transferpuffer (20x) 500 ml Milli Q Wasser 300 ml Methanol (15 %) Ad 2000 ml Milli Q Wasser |

2.1.10. Medien, Antibiotika und Zusatzstoffe

Tabelle 12: Medien, Antibiotika und Zusatzstoffe

| Name | Hersteller | Cat No. |
|-----------------------|----------------------------|---------|
| Amphotericin B Lösung | Sigma-Aldrich (Merck KGaA) | A2942 |
| Ampicillin | Carl Roth GmbH + Co. KG | K029.2 |

| | | |
|---|--------------------------------------|-------------|
| BM-Cyclin | Sigma-Aldrich (Merck KGaA) | 10799050001 |
| DMEM, hoher Glukosegehalt, Pyruvat | Gibco™ (Thermo Fisher Scientific) | 41966052 |
| DMEM, hoher Glukosegehalt, ohne Glutamin | Gibco™ (Thermo Fisher Scientific) | 11960044 |
| DMEM, ohne Glucose | Gibco™ (Thermo Fisher Scientific) | 11966025 |
| Doxycyclin | Sigma-Aldrich (Merck KGaA) | D9891 |
| DPBS, ohne Calcium, ohne Magnesium | Gibco™ (Thermo Fisher Scientific) | 14190094 |
| Fötales Kälberserum (FBS) | Sigma-Aldrich (Merck KGaA) | F0804 |
| Geneticin™ | Thermo Fisher Scientific | 10131027 |
| Hanks' Balanced Salt solution (HBSS) | Sigma-Aldrich (Merck KGaA) | H8264 |
| HyClone™ Fetal Bovine Serum (U.S.), Dialyzed | Fisher Scientific | SH30079.03 |
| Opti-MEM™ | Gibco™ (Thermo Fisher Scientific) | 51985-026 |
| Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml) | Gibco™ (Thermo Fisher Scientific) | 15140122 |
| Puromycin | Gibco™ (Thermo Fisher Scientific) | A1113803 |

2.1.11. Kits

Tabelle 13: Kits

| Name | Hersteller | Cat No. |
|---|---------------------------------|-------------|
| MiSeq Reagent Kit | Illumina | MS-103-1001 |
| NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina® | New England Biolabs GmbH | E7370L |
| NucleoBond Xtra Midi kit for transfection-grade plasmid DNA | MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG | 740410.100 |

NuPAGE™ 4 bis 12 %, Invitrogen™ (Thermo WG1402BOX
Bis-Tris, 1,0 mm, Midi- Fisher Scientific)

Protein-Gele

| | | |
|------------------------------------|--------|-------|
| QIAamp DNA Blood Mini Kit (250) | Qiagen | 51106 |
|------------------------------------|--------|-------|

| | | |
|--|--------|-------|
| QIAquick PCR Purification Kit (250) | Qiagen | 28106 |
|--|--------|-------|

| | | |
|-------------------------------------|--------|--------|
| QIAxcel DNA Screening Kit (2400) | Qiagen | 929004 |
|-------------------------------------|--------|--------|

| | | |
|--|-----------------------------|--------|
| Standard Taq (Mg-free) Reaction Buffer Pack | New England Biolabs GmbH | B9015S |
|--|-----------------------------|--------|

| | | |
|--|---------------|-------------|
| WesternBright Chemilumineszenz Substrat Sirius | Advansta Inc. | K-12043-D20 |
|--|---------------|-------------|

2.1.12. Laborgeräte

Tabelle 14: Laborgeräte

| Name | Hersteller |
|---|----------------------------|
| 2100 Bioanalyzer | Agilent Technologies Inc. |
| Autoklav Systec VE-150 | Systec GmbH |
| BD™ Accuri C6 Flow Cytometer | BD Biosciences |
| Bio Rad Power Pac 200 | Bio-Rad Laboratories GmbH |
| BRAND™ Transferpette™ S 8-/12- Kanal-Mehrkanalpipetten | BRAND GMBH + CO KG |
| Captair Biocap DNA/RNA | Erlab group |
| ChemiDoc™ MP Imaging System | Bio-Rad Laboratories GmbH |
| Criterion™ Blotter | Bio-Rad Laboratories GmbH |
| Eppendorf BioPhotometer® | Eppendorf AG |
| Eppendorf® Centrifuge 5810/5810 R | Sigma-Aldrich (Merck KGaA) |
| Eppendorf® ThermoMixer® C | Sigma-Aldrich (Merck KGaA) |
| Eppendorf™ Mastercycler™ PRO | Fisher Scientific |
| Epson Perfection V200 Photo | Epson GmbH |
| Flüssigkeits-Absaugsystem BVC control | VACUUBRAND GMBH + CO KG |

| | |
|---|---|
| Glaspipetten, 10 ml | A. Hartenstein GmbH |
| Glaspipetten, 2 ml | A. Hartenstein GmbH |
| Glaspipetten, 20 ml | A. Hartenstein GmbH |
| Glaspipetten, 5 ml | A. Hartenstein GmbH |
| Heidolph Unimax 1010 Platformschüttler | Heidolph Instruments GmbH & CO. KG |
| Ikamag Reo Magnetrührer | IKA®-Werke GmbH & CO. KG |
| Kipp-/Rollenmischer | Carl Roth GmbH + Co. KG |
| Liebherr™ Laborkühlschrank | Fisher Scientific |
| Magnetstäbchen ROTILABO® zylindrisch, Ø: 6 mm, 20 mm | Carl Roth GmbH + Co. KG |
| MicroPulser™ Electroporator | Bio-Rad Laboratories GmbH |
| Mikroskop S40-Slider | Leica Microsystems |
| Mr. Frosty™ Gefrierbehälter | Thermo Scientific™ |
| Multipette® M4 | Eppendorf |
| Multitron Inkubationsschüttler | Infors HT |
| NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer | peqLab Biotechnologie GmbH |
| Neubauer-improved Zählkammer | Paul Marienfeld GmbH & Co. KG |
| pH-Meter | Mettler-Toledo GmbH |
| PIPETMAN® L-Pipetten | Gilson |
| pipetus® Akku-betriebene Pipettierhilfe | Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG |
| QIAxcel Advanced Instrument | Qiagen |
| Scotsman Flockeneisbereiter AF 20 | Scotsman |
| Thermo Scientific Biological Safety Cabinet | Thermo Fisher Scientific |
| Thermo Scientific™ Heracell™ 240i CO ₂ -Inkubator | Fisher Scientific |
| Thermo Scientific™ Heraeus™ Fresco™ 17 Mikrozentrifuge | Fisher Scientific |
| Thermo Scientific™ MSC-Advantage™ | Thermo Scientific™ |
| Ultratiefkühlgerät | Thermo Fisher Scientific |
| Vortex-Genie 2 | Scientific Industries, Inc |

| | |
|---|--|
| Wasseraufbereitung Milli-Q® | Merck KGaA |
| Wasserbad | Memmert GmbH + Co. KG |
| Wasserbad | Köttermann |
| XCell4 SureLock™ Midi-Cell | Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific) |
| Z2 Coulter particle count & size analyzer | Beckman Coulter GmbH |

2.1.13. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 15: Verbrauchsmaterialien

| Name | Hersteller | Cat No. |
|--|----------------------------|----------------|
| 0,2 ml 12er PCR-Gefäßstreifen | Starlab International GmbH | I1402-1200 |
| 10 cm-Zellkulturschalen | SARSTEDT AG & Co. KG | 83.3902 |
| 12er Deckelstreifen | Starlab International GmbH | I1400-1200 |
| 12-Strip PCR Caps, Domed | Starlab International GmbH | I1400-1200-c |
| 12-well-Zellkulturplatte (adhärent) | SARSTEDT AG & Co. KG | 83.3921 |
| 15 ml Falcons | Kobe | 188271 |
| 50 ml Falcons | SARSTEDT AG & Co. KG | 62.547.254 |
| 6 cm-Zellkulturschalen | SARSTEDT AG & Co. KG | 83.3901 |
| 6-well-Zellkulturplatte (adhärent) | SARSTEDT AG & Co. KG | 83.3920 |
| 96-well Multiply PCR Plate full skirt | SARSTEDT AG & Co. KG | 72.1980.202 |
| 96-well-Zellkulturplatte (adhärent) | SARSTEDT AG & Co. KG | 83.3924 |
| B Braun™ Cutfix™ Skalpel aus Edelstahl | Fisher Scientific GmbH | 9409804 |
| Blottingpapier | Hahnemühle | BP005 58 60 |
| Combitips® advanced | Eppendorf AG | 0030089812 |

| | | |
|---|-------------------------|-------------|
| Cryo.s™ Einfrierrohrchen, 2 ml | Greiner Bio-One GmbH | 122263 |
| Easycap Reagiergefäß 1,5 ml | SARSTEDT AG & Co. KG | 72.690.550 |
| Filterspitze, 10 µl, Biosphere® plus | SARSTEDT AG & Co. KG | 70.1131.210 |
| Filterspitze, 100 µl, Biosphere® plus | SARSTEDT AG & Co. KG | 70.760.212 |
| Filterspitze, 1000 µl, Biosphere® plus | SARSTEDT AG & Co. KG | 70.762.211 |
| Filterspitze, 20 µl, Biosphere® plus | SARSTEDT AG & Co. KG | 70.760.213 |
| Filterspitze, 200 µl, Biosphere® plus | SARSTEDT AG & Co. KG | 70.760.211 |
| Filtropur S 0.2 | SARSTEDT AG & Co. KG | 83.1826.001 |
| Filtropur S 0.45 | SARSTEDT AG & Co. KG | 83.1826 |
| Halb-Mikro-Küvette, 3 ml | SARSTEDT AG & Co. KG | 67.742 |
| Injekt® 10 ml, Luer- Ansatz, exzentrisch | B. Braun Melsungen AG | 4606108V |
| Pasteurpipetten | Otto E. Kobe KG | 9411015 |
| Pipettenspitze 1000 µl | SARSTEDT AG & Co. KG | 70.762 |
| Pipettenspitze 20 µl, farblos | SARSTEDT AG & Co. KG | 70.1116 |
| Pipettenspitze 200 µl gelb | SARSTEDT AG & Co. KG | 70.706.012 |
| SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml | SARSTEDT AG & Co. KG | 72.706.400 |
| SafeSeal Reagiergefäß 2 ml | SARSTEDT AG & Co. KG | 72.695.500 |
| Transfermembran Immobilon®-P PVDF | Carl Roth GmbH + Co. KG | T831.1 |
| Verschlussfolie PARAFILM® M | Th. Geyer GmbH & Co. KG | 9170002 |

Zellschaber

SARSTEDT AG & Co. KG 83.3951

2.1.14. Programme

Tabelle 16: Programme

| Name | Anbieter |
|-----------------------------|---------------------------|
| BD Accuri™ C6 Plus Software | BD Biosciences |
| Epson Scan | Epson |
| FlowJo | BD Biosciences |
| GraphPadPrism | GraphPad Software |
| Image Lab Software | Bio-Rad Laboratories GmbH |
| Microsoft Office 2019 | Microsoft Corporation |
| ND-1000 v3.8.1 | Thermo Fisher Scientific |
| Photoshop CS6 | Adobe Systems Inc. |
| QIAxcel ScreenGel Software | Qiagen |

2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.1. Kultivierung von Zellen

Alle Experimente mit lebenden Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einer biologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt. Lentiviral transduzierte Zellen oder adenoviral infizierte Zellen wurden unter Laborbedingungen der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37 °C, unter 95 % Luftfeuchtigkeit mit einem CO₂-Gehalt von 5 % in einem Inkubator kultiviert. Die Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit hohem Glukosegehalt (4,5 g/l), versetzt mit 10 % fötalem Kälberserum (FBS), 100 U/ml Penicillin-Streptomycin, sowie 1 µg/ml Amphotericin B gehalten, was im Folgenden als vollständiges DMEM bezeichnet wird. Bevor die Zellen Konfluenz erreichten, wurden sie gesplittet. Zuerst wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit ca. 3 ml *Dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS) gewaschen und anschließend mit 1 ml 1x Trypsin/EDTA für fünf bis zehn Minuten in den Inkubator gestellt, um das Temperaturoptimum von Trypsin zu gewährleisten, damit sich die Zellen lösen. Anschließend wurden die Zellen nach Hinzugabe von frischem Medium resuspendiert und in gewünschter Dichte auf einer

neuen Zellkulturschale ausgesät. Um Kontaminationen mit Mykoplasmen auszuschließen, wurden die Zellen regelmäßig per PCR getestet. Falls eine Kontamination vorlag, wurden die Zellen entweder in einen separaten Inkubator gestellt und mit BM-Cyclin gemäß dem Protokoll des Herstellers behandelt oder verworfen und ein neuer Satz aus dem Vorrat aufgetaut.

2.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese bei einer Konfluenz von ca. 70 % mit 1x Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale gelöst und in DMEM resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einem 15 ml Falcon bei 300 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet in 700 µl Einfriermedium (s. Tabelle 11) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Kryoröhrchen wurden mithilfe eines mit Isopropanol gefüllten Mr. Frosty Gefrierbehälters 1 °C/min auf -80 °C in einem Gefrierkühlschrank heruntergekühlt. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Das Einfriermedium mit den Zellen wurde in ein Falcon überführt und 10 ml DMEM hinzugefügt. Das Falcon wurde fünf Minuten bei 300 x g zentrifugiert, das überschüssige Medium abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml frischem DMEM resuspendiert und ausgesät. 24 Stunden nach dem Auftauen wurde das Medium gewechselt.

2.2.3. Zellzahlbestimmung

Es wurden zwei Methoden zur Zellzahlbestimmung verwendet. Eine Methode beinhaltete den Beckmann Coulter Z2, welcher zur Zählung und Größenbestimmung den elektrischen Widerstand von Teilchen oder Zellen in einer leitfähigen Flüssigkeit misst (Cellular Analysis using the Coulter Principle: Measurement with Great Accuracy and Speed, 2022). Dazu wurden 100 µl einer Zellsuspension zu 10 ml isotoner Lösung hinzugegeben, vom Gerät gemessen und eine Zellzahl pro Milliliter angegeben.

Für die zweite Methode wurde eine Neubauer-improved Zählkammer verwendet. Es wurden 10 µl einer Zellsuspension zwischen Neubauer Zählkammer und Deckglas aufgetragen und unter dem Mikroskop die Zellen eines Quadrats mit einer Kantenlänge von 1 mm, welches in 25 kleinere Quadrate unterteilt ist, gezählt. Es wurden zwei Quadrate ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Aufgrund der Tiefe der Zählkammer von 0,1 mm und der Kantenlänge der Quadrate von 1 mm, ergibt sich durch die Zählung die Zellzahl pro 0,1 µl. Um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten, wurde der Wert mit 10.000 multipliziert.

2.2.4. Zellen unter Nährstoffmangel setzen

Nachdem die Zellen am Vortag in vollständigem DMEM ausgesät worden waren, wurde 24 Stunden später der Nährstoffmangel induziert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und das neue Medium hinzugegeben. Im Fall von HBSS wurde auf FBS verzichtet, um vollständigen Nährstoffmangel herbeizuführen und im Fall des Glutamin- und Glukoseentzugs wurde das Medium mit 10 % dialysiertem FBS versetzt, um Verfälschungen durch das Serum auszuschließen, aber trotzdem das Wachstum der Zellen zu fördern. In einigen Experimenten wurde der Nährstoffentzug nach einigen Tagen abgebrochen und das Medium zu vollständigem DMEM gewechselt, damit die Zellen, die den Nährstoffentzug überlebt hatten, sich vermehren konnten, um ein deutlicheres Ergebnis zu generieren.

2.2.5. Zellbehandlung mit Medikamenten

24 Stunden nach Aussaat der Zellen wurde eine Behandlung begonnen, indem die zuvor ausgerechnete Menge des Medikaments (z.B. Nutlin) zum Medium hinzugefügt wurde, um eine bestimmte Konzentration zu erreichen.

2.2.6. Transfektion mit Lipofectamine® 2000

Um Zellen mit der *TP53^{R175}*-Mutations-Library mittels Lipofectamine® 2000 zu transfizieren, wurden am Vortag 1,6 Millionen Zellen auf 10 cm-Schalen ausgesät. Die Lösungen wurden, wie in Tabelle 17 angegeben, in Falcons vorbereitet und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung aus Falcon A langsam zur Lösung B hinzu pipettiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die zu transfizierenden Zellen einmal mit DMEM ohne Antibiotika und FBS gewaschen und anschließend 8 ml DMEM ohne Antibiotika und FBS vorgelegt, sodass 2 ml der Transfektionslösung tropfenweise hinzugefügt werden konnten. Nach vier bis sechs Stunden Inkubation bei 37 °C wurde das Medium zu frischem DMEM gewechselt.

Tabelle 17: Transfektion mit Lipofectamine® 2000

| | Inhalt | Menge/ 10 cm-Schale |
|-----------------|---------------------------|----------------------------|
| Falcon A | Opti-MEM™ | 1 ml |
| | HR700_R175_mutant_library | 6,25 µg |
| | Px330sgRNA_in5_p53+T | 6,25 µg |
| Falcon B | Opti-MEM™ | 1 ml |
| | Lipofectamine® 2000 | 23 µl |

2.2.7. Selektion mit Puromycin

Die Selektion der transfizierten Zellen wurde drei Tage nach der Transfektion mit 0,7 µg/ml Puromycin begonnen. Nach weiteren vier Tagen wurden die Zellen einmal mit DMEM gewaschen und es erfolgte ein Wechsel zu vollständigem DMEM mit zusätzlichen 10 % FCS, um die Erholung und das Wachstum der Zellen zu fördern.

2.2.8. Lentiviraler Gentransfer

2.2.8.1. Herstellung von Lentiviren mit Calciumphosphat

Zur Herstellung von Lentiviren wurden HEK-293T-Zellen verwendet. Zunächst wurden 5 Millionen Zellen auf einer 10 cm-Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wurde vier Stunden vor der Transfektion das Medium gewechselt. In Falcon A wurden Wasser und Calciumchlorid vorgelegt und die DNA hinzu pipettiert. In Falcon B wurden 1,5 ml 2x HBS gegeben. Während Falcon B mithilfe eines Vortexschüttlers gemischt wurde, erfolgte die Zugabe des Inhalts aus Falcon A tropfenweise. Nach weiteren zehn Sekunden intensiven Schüttelns wurde die Lösung für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die 3 ml zum Medium der HEK-Zellen hinzugegeben und diese einen Tag bei 37 °C inkubiert. 24 Stunden später wurde das Medium abgesaugt und 8 ml frisches Medium langsam dazugegeben. Der Virusüberstand wurde nach weiteren 24 und 48 Stunden mit einer Spritze aufgenommen, anschließend durch einen Filter (0,45) in einem Falcon gesammelt und bei -80 °C eingefroren.

Tabelle 18: Herstellung von Lentiviren mit Calciumphosphat

| | Inhalt | Menge |
|----------|---|--------------|
| Falcon A | pInducer20 TAp73 α / pInducer20 TAp73 β | 20 μ g |
| | psPAX2 | 13 μ g |
| | pMD2.G | 7 μ g |
| | CaCl (2,5 M) | 150 μ l |
| | Aqua ad iniect. | Ad 1,5 ml |
| Falcon B | 2x HBS | 1,5 ml |

2.2.8.2. Lentivirale Transduktion

Es wurden jeweils 500.000 Zellen auf zwei 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät. 24 Stunden später wurde das Medium auf beiden Schalen abgesaugt. Die eine Schale diente als Kontrolle und es wurden 5 ml frisches Medium und 5 μ l Polybren hinzugegeben. Auf die zu infizierenden Zellen wurden 4 ml Virusüberstand, 1 ml Medium und 5 μ l Polybren gegeben. Nach 24 Stunden wurden 5 ml Medium jeweils zu den Schalen hinzugegeben.

2.2.9. Selektion mit Geneticin

30 Stunden nach dem lentiviralen Gentransfer wurden Zellsuspensionen von den transduzierten Zellen sowie den Kontrollzellen hergestellt und diese in drei verschiedenen Zelldichten unter Hinzugabe von Geneticin mit einer Konzentration von 0,4 mg/ml ausgesät. Das Medium wurde je nach Anzahl toter Zellen ca. alle 48 h gewechselt, bis die Selektion nach ungefähr sechs Tagen abgeschlossen war. Dieser Abschluss war dadurch gekennzeichnet, dass auf den Kontrollplatten keine lebenden Zellen mehr vorhanden waren, was mikroskopisch verifiziert wurde. Um den Selektionsdruck aufrecht zu halten, erfolgte auch nach Abschluss der Selektion die Kultivierung der Zellen mit Geneticin bei einer Konzentration von 0,2 mg/ml.

2.2.10. Verwendung des pInducer20 Vektors

Das lentivirale pInducer20-Konstrukt wurde transduziert, um eine Doxycyclin-induzierbare Expression von TAp73 α und TAp73 β zu ermöglichen. Nach dem Gentransfer und abgeschlossener Selektion wurde die Expression von TAp73 α und TAp73 β nach Behandlung mit Doxycyclin mittels Western Blot und Koloniebildungstest verifiziert.

2.2.11. Adenovirale Cre Rekombinase Infektion

Die Infektion der HCT116 *TP53^{A/LSL-R175-Library}* mit adenoviraler Cre-Rekombinase diente zur Entfernung der LoxP-Stop-LoxP-(LSL)-Kassette im Intron 4 von *TP53*, um die Expression der *TP53*-Mutationen zu aktivieren. Dies wurde mit zwei Methoden und Viren durchgeführt.

Bei der ersten Methode wurden am Vortag drei Millionen Zellen auf einer 10 cm-Schale ausgesät. Die adenovirale Cre-Rekombinase wurde auf Eis aufgetaut. Die Vorbereitung der Viruslösung erfolgte durch Hinzugabe von 4 µl des Adenovirus zu 3 ml DMEM ohne Antibiotika und FBS. Die zu infizierenden Zellen wurden einmal mit DMEM ohne Antibiotika und FBS gewaschen und anschließend 3 ml der Viruslösung auf die Platte gegeben und diese vorsichtig geschwenkt. Die Zellen wurden 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, dabei alle zehn Minuten vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurde die Viruslösung entfernt und vollständiges DMEM hinzugefügt.

Bei der zweiten Methode wurden am Vortag 1,5 Millionen Zellen pro 10 cm-Schale ausgesät. Die adenovirale Cre Rekombinase wurde im Verhältnis 1:10 in PBS/10% Glycerol verdünnt und die Zellen mit einer *Multiplicity of Infection* (MOI) von 10 bis 25 infiziert. Die Viruslösung bestand aus dem Virus und 4,2 ml DMEM ohne Antibiotika und FBS. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei 37 °C wurden 5,8 ml vollständiges DMEM hinzugefügt. Es erfolgte ein Mediumwechsel nach 24 Stunden.

Der Erfolg der Infektion konnte mittels Durchflusszytometrie überprüft werden, da die LSL-Kassette ein *Green Fluorescent Protein* (GFP)-Gen enthielt und somit die Zellen nach erfolgreicher Cre-Rekombinase-vermittelter Rekombination GFP-negativ waren. Der Anteil der GFP-positiven Zellen und damit das gemessene GFP-Signal wurde geringer, sodass nach neun bis zehn Tagen mit weiteren Experimenten fortgeföhren werden konnte.

2.2.12. Generierung von Einzelzellklonen,

Zur Generierung von Einzelzellklonen wurde eine Zellsuspension mit 200 Zellen/ 20 ml hergestellt. Die 20 ml der Zellsuspension wurden auf zwei 96-well-Platten mit jeweils 100 µl der Suspension pro Well verteilt. 24 Stunden später wurde per Mikroskop überprüft, in welchen Wells sich eine Zelle befand und diese markiert. Nach einer Woche wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und nach weiteren sieben Tagen erfolgte die

Übertragung der Zellen auf 12-Well-Platten. Die Zellen wurden weiter vermehrt, um ein Aliquot einzufrieren und die Einzelzellklone anschließend analysieren zu können.

2.2.13. Funktionelle Charakterisierung der Einzelzellklone

Die gewachsenen Einzelzellklone der HCT116 *TP53^{A/LSL}* TAp73 α - und HCT116 *TP53^{A/LSL}* TAp73 β -Zellen wurden auf die Doxycyclin-induzierte Expression von p73 mittels Western Blot untersucht. Aufgrund der apoptotischen Eigenschaften von p73 wurde eine Durchflusszytometrie mit Propidiumiodid durchgeführt sowie eine Durchflusszytometrie mit BrdU, um den Zellzyklusarrest durch p73 nachzuweisen. Außerdem konnte dies optisch im Koloniebildungstest bestätigt werden.

2.2.14. Koloniebildungstest (*Colony Formation Assay*)

Um ein unterschiedliches Wachstumsverhalten von Zellen darzustellen, wurde neben einer Behandlung eine Kontrolle durchgeführt. Sobald die Zellen der Kontroll-Zellkulturschale nach ca. sieben bis zehn Tagen konfluent waren, wurde das Medium auf allen Zellkulturschalen abgesaugt, die Zellen einmal mit DPBS gewaschen und anschließend 3 ml Ethanol vorsichtig hinzugegeben. Nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 4 °C wurde das Ethanol abgesaugt und die Zellen nach der Trocknung mit 3 ml Kristallviolettlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung der Lösung wurden die Zellkulturschalen mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingescannt.

2.2.15. Durchflusszytometrie (*FACS*)

Ein Durchflusszytometer misst mit einem Laserstrahl und verschiedenen Detektoren, die die Lichtstreuung messen, die Größe (FSC- *forward scatter*) und Komplexität im Hinblick auf Partikel und Granula (SSC- *side scatter*) von Zellen (McKinnon, 2018). Es wurden ca. 10 - 20.000 Ereignisse einer Zellsuspension gemessen. Um Zelldebris auszuschließen, wurde ein *Gate* mit einem hohen FSC- und niedrigen SSC-Wert markiert und auf die Proben einer Messung angewandt. Mithilfe der BD-Standardkonfiguration mit dem FL1-Detektor und dem 488 nm-Laser wird das GFP-Signal gemessen (BD AccuriTM C6 Flow Cytometer Optical Filter Guide). Die Cre-Rekombinase-vermittelte Rekombination der HCT116 *TP53^{A/LSL-R175-Library}* wurde verifiziert, indem der Anteil der GFP-positiven und -negativen Zellen gemessen wurde.

2.2.15.1. Durchflusszytometrie mit Propidiumiodid

Propidiumiodid (PI) ist ein rot fluoreszierender Farbstoff, der mit der DNA interkaliert. Er dient zur Beurteilung des Anteils apoptotischer Zellen, da diese DNA verlieren und damit einen niedrigeren DNA-Gehalt aufweisen, welcher als subG1 gemessen werden kann (Riccardi and Nicoletti, 2006). Damit die Messung DNA-spezifisch ist, muss eine RNase verwendet werden. Zur Bestimmung des Anteils toter Zellen wurde das Medium, in dem die Zellen kultiviert und behandelt wurden, und das DPBS, mit dem die Zellen gewaschen wurden, in einem Falcon gesammelt. Die Zellen wurden trypsiniert und eine 5 ml-Zellsuspension hergestellt und zum restlichen Falcon gegeben. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 300 x g wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in 500 µl DPBS resuspendiert. Anschließend wurden 4,5 ml Ethanol (98 %) langsam unter Schütteln des Falcons hinzugegeben und die Zellen zunächst auf Eis zwischengelagert und anschließend für 24 Stunden bei -20 °C gekühlt. Die Falcons wurden gevortext und 1,5 ml der Suspension in 1,5 ml-Reagiergefäße gefüllt. Diese wurden zehn Minuten bei 4 °C und 5000 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Nach einem Waschvorgang mit PBS wurden die Zellen erneut zehn Minuten bei 5000 x g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Tabelle 19: Färbemischung Propidiumiodid

| Name | Menge pro Probe |
|-------------------------------|----------------------------|
| PBS | 200 µl |
| Propidiumiodid (0,2 µg/ml) | 1 µl |
| RNase | 2 µl |

Zur Herstellung der Färbemischung (s. Tabelle 19) wurde jede Probe in 203 µl resuspendiert, anschließend wurden die Proben 10 - 13 Minuten lang in einem Thermoblock bei 37 °C erwärmt. Die Messung erfolgte unmittelbar danach. Propidiumiodid wird mit dem FL2-Detektor und dem PE-Filter gemessen (BD AccuriTM C6 Flow Cytometer Optical Filter Guide). Es wurde ein *Virtual Gain* über die Proben gelegt, damit die Phasen des Zellzyklus sichtbar übereinander lagen, und für jede Probe der subG1-Bereich markiert und dessen Anteil bestimmt werden konnte (s. Abbildung 8).

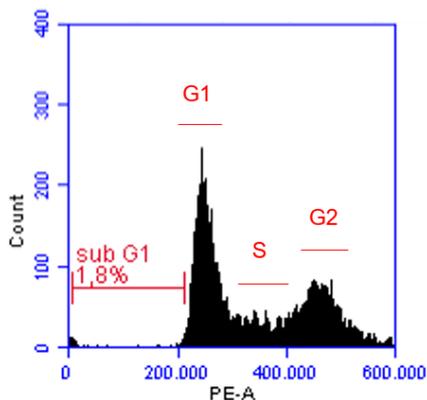


Abbildung 8: Gates Durchflusszytometrie mit Propidiumiodid

2.2.15.2. Durchflusszytometrie mit BRDU zur Zellzyklusanalyse

Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidin-Analogon, welches während der DNA-Replikation in die DNA eingebaut und zur Markierung sich teilender Zellen eingesetzt wird. Das in die Zellen inkorporierte BrdU wird mit einem fluoreszierenden Antikörper gefärbt. Zu analysierende Zellen wurden mit 10 μM BrdU für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden diese Zellen trypsinisiert, resuspendiert und für zehn Minuten bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in 0,5 ml PBS resuspendiert. Daraufhin wurde tropfenweise Ethanol (70 %) zur Fixierung hinzugegeben und die Proben bei 4 °C gekühlt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 1000 x g für 10 Minuten. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen zur Denaturierung der DNA in 1 ml frisch angesetztem 2 M HCL/Triton X-100 resuspendiert. Nach Überführung in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße wurden die Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und alle zehn Minuten sanft gemischt. Nachfolgend wurden die Zellen bei Raumtemperatur für zehn Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 1 ml Natriumtetraborat gelöst und erneut für fünf Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Daraufhin wurden die Zellen in 0,5 % Tween 20 + 1 % BSA für 30 Minuten geblockt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 100 μL PBS/ 0,5 % Tween 20 + 1 % BSA mit 5 μL α - BrdU Alexa488 resuspendiert und 45 Minuten bei Raumtemperatur in der Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit 1 ml PBS/ 0,5 % Tween 20 + 1 % BSA gewaschen, in der oben beschriebenen 203 μL Propidiumiodid Färbelösung (s. Tabelle 19) resuspendiert und bei Raumtemperatur für zehn Minuten inkubiert. Die Proben wurden bis zur durchflusszytometrischen

Messung auf Eis zwischengelagert. Nachdem der Zelldebris bei der Messung mithilfe des Gatings ausgeschlossen wurde, wurde auf der x-Achse der PE-A-Kanal und auf der y-Achse der FITC-Kanal gemessen. Mit dem PE-Kanal wurde das Propidiumiodid-Signal und damit der DNA-Gehalt der Zellen erhoben. Somit konnten die Gates für G1 und G2 gesetzt werden. Auf der y-Achse wurde mit dem FITC-Kanal der Anteil des BrdU-Antikörpers gemessen, sodass oberhalb von den G1- und G2-Phasen-Gates ein Gate für die S-Phase mit erhöhtem BrdU-Anteil gesetzt werden konnte (s. Abbildung 9).

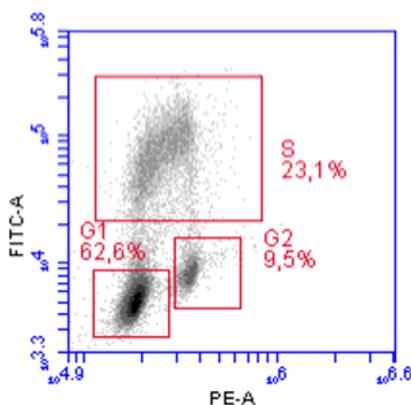


Abbildung 9: Gates Durchflusszytometrie mit BrdU

2.2.16. Ernten von Zellen

2.2.16.1. Ernten von Zellen für Western Blots

Um Zellen für einen Western Blot zu ernten, wurden die Zellkulturschalen auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und die Zellen mit 4 °C kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml PBS pro 10 cm-Zellkulturschale verwendet und die Zellen mit einem Zellschaber mechanisch von der Platte gelöst. Das PBS mit den abgelösten Zellen wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und weiterhin gekühlt. Bei 300 x g wurden die Zellen 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und das PBS abgesaugt. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C zwischengelagert.

2.2.16.2. Ernten von Zellen zur DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in DMEM resuspendiert. Nach Überführung in ein Falcon erfolgte ein weiterer

Waschvorgang mit 1 ml PBS. Das Zellpellet wurde nach der fünfminütigen Zentrifugation mit 300 x g bei -20 °C eingefroren und zwischengelagert.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. CRISPR/Cas9

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR/Cas9) ist eine Methode, mit der an gezielten Orten Veränderungen im Genom herbeigeführt werden können (Jinek et al., 2012). Zur Erstellung der *TP53R175*-Mutationslibrary wurden die HCT116 *TP53^{A/LSL}*-Zellen unter Verwendung von Lipofectamine® 2000 mit der sgRNA und der Reparaturvorlage kotransfiziert. Die sgRNA Px330sgRNA_in5_p53+T enthält Cas9 und eine sgRNA zum Intron 5. Als Reparaturvorlage für die *Homology directed repair* (HDR) diente der Vektor HR700_R175_mutant_library mit den verschiedenen *TP53R175*-Mutationen und homologen Codons von Exon 4 bis Intron 6, sowie einer mutierten PAM-Region und einer LSL-Kassette, welche *GFP* und *pac* enthält. *Pac* kodiert für Puromycin-N-Acetyltransferase und generiert die Puromycin-Resistenz, um eine Selektion zu ermöglichen.

2.3.2. Elektrotransformation von Bakterien

Transformation bezeichnet die Aufnahme freier DNA von Prokaryoten. Mittels Elektroporation wird die Bakterienmembran durchlässig und kann umliegende DNA aufnehmen (Kumar et al., 2019). 100 µl elektrokompetente *E. coli* (DH10B) Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 1,5 µl des 1:100 oder 1:1000 verdünnten Plasmids hinzugegeben. In einer Küvette wurde mithilfe des MicroPulse Elektroporators ein Stromstoß mit 1800 V für ca. 5 ms gegeben. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium hinzugegeben, die Zellen resuspendiert und in einem Reagenzglas für 30 Minuten bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. Mit einer Öse wurde ein Teil auf einer LB-Agar-Platte, welche das Selektionsantibiotikum, in diesem Fall Ampicillin, enthält, ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Nach Überführung in 100 ml LB-Medium wurden 100 µL Ampicillin hinzugegeben und über Nacht im Schüttler inkubiert.

2.3.3. Midi-Plasmid Präparation

Am Vortag wurde eine einzelne Bakterienkolonie der beimpften Agarplatte in 100 ml LB-Medium mit 100 µL Ampicillin überführt und bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Plasmid Präparation erfolgte mit dem *NucleoBond Xtra Midi kit for transfection-grade*

plasmid DNA nach den Herstellerangaben von MACHEREY-NAGEL. Das Pellet wurde in reinem Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.3.4. Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA (gDNA) wurde das *QIAamp DNA Blood Mini Kit* von Qiagen verwendet. Mit den zuvor gewonnenen Zellpellets wurde nach Herstellerangaben verfahren. Vor der Eluierung wurden die Proben mindestens 30 Minuten auf den Säulen inkubiert.

2.3.5. Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration mittels

NanoDrop

Mit dem Nanodrop ND-1000 wurden DNA-Konzentrationen bestimmt. Das Spektralphotometer misst in einer 1 µl-Probe die Absorption der DNA, welche im Wellenlängenbereich von 260 nm liegt, und berechnet daraus anschließend die Konzentration (NanoDrop Technologies).

2.3.6. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerasekettenreaktion werden DNA-Abschnitte amplifiziert. Dabei wird die DNA zunächst bei 95 °C denaturiert, daraufhin hybridisieren die Primer und anschließend erfolgt mit der DNA-Synthese die Elongation der Primer bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der GoTaq® DNA-Polymerase. Für eine Extension von 1 kb DNA wurde eine Minute veranschlagt.

2.3.7. *Nested PCR*

Bei der *Nested polymerase chain reaction* (PCR) werden zwei PCR-Reaktionen hintereinandergeschaltet, um ein sensitiveres und spezifischeres Ergebnis für die Sequenzierung zu erzielen. Das PCR-Produkt der ersten PCR diene als Vorlage für die zweite Barcode PCR, bei der die Primer innerhalb des ersten PCR-Produkts verwendet wurden und somit ein kürzeres, nur die Mutationen enthaltende, DNA-Fragment vervielfacht wurde. Zwischen den beiden PCR-Durchgängen wurden die Proben mit dem QIAquick PCR Purification Kit von QIAGEN nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 30 - 50 µl reinem Wasser gelöst.

2.3.7.1. *Nested PCR I*

Bei dem ersten Schritt der *Nested PCR* setzte der *forward* Primer (#10255) im Intron 4 von *TP53* an und der *reverse* Primer (#6535) im Exon 7, sodass ein ca. 1,6 kb DNA-

Fragment entstand, welches als Vorlage für die zweite PCR diente. Es wurden fünf Reaktionen pro Probe parallel durchgeführt, welche anschließend zusammengeführt wurden. Die PCR wurde wie in Tabelle 20 angegeben durchgeführt.

Tabelle 20: Reagenzien und Thermocycler-Programm *Nested* PCR I

| Reagenzien | Menge pro Reaktion | Thermocycler Programm |
|---------------------|--------------------|-----------------------|
| gDNA | 150 ng | |
| #6535 (10 µM) | 1 µl | |
| #10255 (10 µM) | 1 µl | 95 °C 2 min |
| GoTaq Buffer (5x) | 4 µl | 95 °C 30 s |
| dNTPs (10 mM) | 0,4 µl | 59 °C 60 s |
| DMSO | 1 µl | 72 °C 30 s |
| GoTaq® G2 DNA | 0,2 µl | 72 °C 5 min |
| Polymerase (5 U/µl) | | 4 °C ∞ |
| H ₂ O | Ad 20 µl | |

} X 20

2.3.7.2. *Nested* PCR II (Barcode PCR)

Die aufgereinigte DNA-Sequenz-Vorlage der ersten PCR wurde 1:1000 verdünnt. Der *forward* Primer (#9624) hybridisierte im Exon 5 und die *reverse* Primer (#10540, #10541, #10542) an der mutierten PAM-Sequenz im Intron 5, sodass spezifisch das mutierte Allel amplifiziert wurde, weil das andere Allel an derselben Stelle eine Deletion trägt. Die *reverse* Primer beinhalteten auch Barcode-Sequenzen für die einzelnen Replikate, um nach der Sequenzierung auf die Replikate zurückschließen zu können. Die Menge an MgCl₂ und dNTPs wurde reduziert, um die Spezifität zu erhöhen. Die PCR wurde wie in Tabelle 21 angegeben mit fünf Reaktionen pro Probe durchgeführt. Nach der Aufreinigung erfolgten die Messung und der Nachweis des ca. 240 bp langen Fragments mit dem *QIAxcel DNA Screening Kit* und dem *QIAxcel Advanced Instrument*.

Tabelle 21: Reagenzien und Thermocycler-Programm *Nested* PCR II (Barcode PCR)

| Reagenzien | Menge pro Reaktion | Thermocycler Programm |
|---|--------------------|-----------------------|
| DNA-Vorlage (<i>Nested</i> I) | 1 μ l | |
| #9624 (10 μ M) | 1 μ l | |
| #10540 (10 μ M) / | | |
| #10541 (10 μ M) / | 1 μ l | |
| #10542 (10 μ M) | | 95 °C 2 min |
| MgCl ₂ (25 mM) | 1 μ l | 95 °C 30 s |
| Standard Taq (Mg-free) | 2 μ l | 66 °C 30 s |
| Reaction Buffer | | 72 °C 30 s |
| dNTPs (10 mM) | 0,1 μ l | 72 °C 5 min |
| DMSO | 1 μ l | 4 °C ∞ |
| GoTaq® G2 DNA Polymerase (5 U/ μ l) | 0,2 μ l | |
| H ₂ O | Ad 20 μ l | |

X 24

2.3.8. Vorbereitung der Amplikon Library Sequenzierung

Zur Vorbereitung der Amplikon Sequenzierung wurde das *NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina®* verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Dies beinhaltet Enzyme, Oligonukleotid-Adapter und Primer sowie AMPure XPR Beads. Zuerst wurden die Amplikons repariert und ein dA-Schwanz, also ein zusätzliches Adenin am 5'-Ende angehängt. An diesen dA-Schwanz wurden die NEBNext-Adapter für die Illumina Sequenzierung gebunden. Um die Adapter zu trennen, wurde ein USER-Enzym verwendet, welches ein Uracil entfernt und so eine einzelne Nukleotidlücke generiert. AMPure XP R Beads wurden im genauen Verhältnis (0,45 und 0,25 x) zur Größenselektion und Aufreinigung verwendet. Anschließend erfolgte zur Vermehrung eine PCR mit Primern, die komplementär zu den Adaptern sind. Eine Qualitätskontrolle erfolgte mit dem Agilent Bioanalyzer. Die Vorbereitung der Amplikon Library zur Sequenzierung wurde von der Core Facility „Genomics“ des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

2.3.9. Amplikon Sequenzierung

Die Amplikon Sequenzierung erfolgte mit einem Illumina MiSeq mit 2x 250 Basenpaaren-end reads. Durch die Verwendung von Barcodes für die einzelnen Replikate konnten die Proben gemultiplext und nach der Sequenzierung demultiplext werden. Die Primer-Sequenzen wurden als exakte *matches* identifiziert und geschnitten, sodass nur vollständige Primer-Sequenzen gezählt wurden. Die erhaltenen *reads* wurden mit einem Set von in-silico vorkompilierten bearbeiteten Code-Sequenzen verglichen, welche jede mögliche Aminosäureänderung von R175 repräsentierten. Um Sequenzierartefakte zu verhindern, wurden nur genau passende *reads* berücksichtigt und gezählt. Wenn keine Übereinstimmung vorlag, wurden die gefundenen *reads* verworfen. Die Amplikon Sequenzierung wurde von der Core Facility „Genomics“ des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Relative Werte ergaben sich durch Division der Rohwerte durch die Summe aller berücksichtigten Sequenzen ohne Wildtyp (Originalsequenz) und *no-match*. Zur Berechnung des *Fold change* (Verhältnis eines Werts zu einem Kontrollwert) wurde ein Wert durch den jeweiligen Wert der unbehandelten Kontrolle geteilt.

2.3.9.1. Darstellung der Sequenzierergebnisse

Zur Darstellung der Sequenzierungsergebnisse wurden Heatmaps verwendet. Eine Heatmap ist ein Diagramm zur Datenvisualisierung, in dem jedes Rechteck einen Wert repräsentiert, welcher farbkodiert dargestellt wird, sodass sich ein Trend in einer größeren Datenmenge einfacher erkennen lässt. Die Farbskalierung erfolgte anhand des *Fold change*, welcher das Verhältnis eines relativen Wertes des Vorhandenseins einer Mutation nach einer medikamentösen Behandlung oder einem Nährstoffentzug zum jeweiligen relativen Wert der Mutation in der unbehandelten Kontrolle darstellt. Ein rotes Rechteck bedeutet also eine Anreicherung bis zu einem dreifachen Wert. Wenn die Werte gleich sind und sich somit ein *Fold change* von 1 ergibt, wird das in weiß gezeigt. Blaue Rechtecke repräsentieren im Vergleich zur Kontrolle depletierte Werte.

2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Herstellung von Zelllysaten

Die tiefgefrorenen Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und die Proteine mittels Lysepuffer isoliert. Dem NP-40 Lysepuffer (s. Tabelle 11) wurde Proteaseinhibitor (10x) im Verhältnis 1:10 hinzugefügt. Pro Zellpellet wurden je nach Größe 30 - 50 μ l

Lysepuffer verwendet und darin resuspendiert. Die Proben wurden in SafeSeal Reagiergefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Dieser Gefrier-Tau-Zyklus erfolgte drei Mal. Nach dem Auftauen der Proben auf Eis wurden diese bei 4 °C und 13.000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde in neue Reagiergefäße überführt und bei jeder Probe eine neue Pipettenspitze verwendet.

2.4.2. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration der Lysate wurde kolorimetrisch nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). In jeder Küvette wurden 100 µl NaCl-Lösung (150 mM/l) vorgelegt, 2 µl der Probe und 1 ml Bradford Reagenz (s. Tabelle 10) hinzugefügt. Die Proben wurden vorsichtig mit einem Vortexschüttler gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zuerst wurde am Fotometer eine Blindprobe, die nur Kochsalzlösung und Bradford-Reagenz enthielt, eingestellt. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde eine BSA-Standardreihe verwendet.

2.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um Proteine nach ihrer Molekülmasse aufzutrennen, wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Proben wurden wie in Tabelle 22 angegeben vorbereitet und für 10 Minuten im Thermomixer bei 70 °C erhitzt. In eine XCell4 SureLock™ Midi-Cell-Kammer wurde ein Bis-Tris-Gel eingebracht und MES-Puffer (1x) verwendet. In der inneren Kammer wurde zusätzlich Antioxidans hinzugefügt. Der Kamm des Gels wurde entfernt und die Taschen zunächst mit einer Spritze gespült. Die Taschen wurden mit den Proben befüllt und an den Rändern 4 µl *Prestained Protein Ruler* als Marker aufgetragen. Das Gel lief für 15 Minuten bei 80 V und anschließend für ca. zwei Stunden bei 140 V, bis die Proben das Ende des Gels erreichten.

Tabelle 22: Probenzusammensetzung SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

| Reagenz | Menge |
|--------------------------------------|---------------------|
| Protein | 25-30 μg |
| NuPAGE™ Probenreduktionsmittel (10x) | 2 μl |
| NuPAGE™ LDS-Probenpuffer (4x) | 5 μl |
| NP-40 Lysepuffer | Ad 20 μl |

2.4.4. Western Blot

Um die per Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen, wurden diese auf eine PVDF-Transfermembran übertragen. Dazu wurde das Criterion™ Blotter-System von Bio-Rad Laboratoires verwendet.

Tabelle 23: Vorbehandlung der PVDF-Membran

| Vorbehandlung | Dauer (min) |
|----------------------|--------------------|
| Methanol | 1 |
| Milli Q Wasser | 2 |
| Blotpuffer | 5 |

Die PVDF-Membran und das Whatman-Papier wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten und die PVDF-Membran, wie in Tabelle 23 angegeben, vorbehandelt.

Der Blotpuffer wurde in eine Wanne gefüllt, die Komponenten darin getränkt und nach dem Muster in Tabelle 24 vorbereitet. Da keine Luftblasen zwischen Gel und PVDF-Membran vorhanden sein sollten, wurden diese mit Hilfe eines Rollers entfernt.

Tabelle 24: Anordnung der Gelkassette

Reihenfolge

Anode (rote Klemme)

3x Schwamm

1x Whatmanpapier

PVDF-Membran

Gel

1x Whatmanpapier

3x Schwamm

Kathode (schwarze Klemme)

Der Criterion™ Blotter wurde mit Transferpuffer zur Hälfte befüllt und mit einem Kühlpack sowie einem Magnetrührstab beladen. Die Gelkassette wurde den Farben entsprechend zugeordnet und eingefügt und das System anschließend mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Blot erfolgte im Kühlraum bei 4 °C auf einem Magnetrührer, um eine konstante Temperatur zu gewährleisten und der entstehenden Wärme entgegenzuwirken. Der Blot wurde mit einer Dauer von ca. 1,5 Stunden durchgeführt und die Stromstärke des Transformators so gewählt, dass sich eine Spannung von 100 V einstellte. Nach dem Blot wurde die Membran für 1 - 1,5 Stunden in Blockmilch (s. Tabelle 11) gelegt.

2.4.5. Immundetektion

Die Membran wurde nach dem Blot entsprechend der zu erwartenden Banden mit einem Skalpell geschnitten und beschriftet. Die Primärantikörper wurden wie in Tabelle 5 angegeben in Blockmilch verdünnt und die Membranfragmente mit diesen in den jeweiligen Falcons über Nacht im Kühlraum bei 4 °C auf einem Rollenmischer inkubiert. Anschließend wurden die Fragmente fünf Mal für zehn Minuten mit TBST-Puffer gewaschen. Nach den Waschsritten erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Sekundärantikörpern (s. Tabelle 11) in 15 ml Blockmilch für zwei Stunden. Nachfolgend wurde der Waschvorgang im selben Schema wie nach den Primärantikörpern wiederholt. Die Detektion erfolgte mit dem Bio Rad ChemiDoc™ MP Imaging System und dem Programm Image Lab. Für die Erfassung wurden auf die Membran WesternBright Chemilumineszenz Substrat Sirius aufgetragen und verschiedene Belichtungszeiten verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Analyse der proliferativen Fitness-Effekte von R175-Mutationen unter MDM2-Inhibition

3.1.1. Expression einer R175-Mutationslibrary in HCT116-Zellen

Zur Untersuchung der verschiedenen $TP53^{R175}$ -Mutationen wurden die mit der $TP53^{R175}$ -Mutationslibrary transfizierten HCT116 Zellen verwendet. Diese waren ursprünglich $TP53^{WT}$ und vorab in der Arbeitsgruppe mittels CRISPR/Cas9 bereits derart verändert worden, dass ein $TP53$ -Allel durch eine Deletion inaktiviert wurde. In das zweite Allel wurde eine reversible Stop-Kassette (LSL) integriert, die eine genetische Editierung ermöglicht (s. Abbildung 10A). Mit einer gegen Intron 5 gerichteten Cas9-Nuklease wurde im Allel mit der LSL-Kassette die $TP53^{\Delta/LSL-R175-Library}$ mittels HDR eingefügt. Die mutierte PAM-Region verhinderte eine weitere Bindung durch die Cas9-Nuklease. Das eingebaute Allel generierte eine Puromycin-Resistenz. Da die Zellen vor der Editierung aufgrund einer Mutation Puromycin sensibel waren, konnte anschließend eine Selektion mit Puromycin durchgeführt werden. Die LSL-Kassette der HCT116 $TP53^{\Delta/LSL-R175-Library}$ verhinderte die Expression der transfizierten $TP53$ -Mutationen. Um diese zu entfernen, wurde eine adenovirale Cre-Infektion durchgeführt. Mit der Entfernung der LSL-Kassette wurde ebenfalls das GFP -Gen entfernt. Zur Überprüfung des Rekombinationserfolgs und daraus folgender Expression der $TP53^{R175}$ -Mutationen wurden durchflusszytometrische GFP-Messungen durchgeführt. Der Anteil GFP-positiver Zellen sank von initial 93 % vor der Cre-vermittelten Rekombination auf 34 % fünf Tage nach der Cre-Infektion und in den Folgetagen weiter (s. Abbildung 10B). An Tag 15 lag der Anteil GFP-positiver Zellen bei einem Tiefpunkt von 25 % (s. beispielhaft in Abbildung 10C), sodass von 68 % rekombinierter, die p53-Mutationen exprimierender Zellen ausgegangen werden konnte. Daraufhin wurde mit den Folgeexperimenten und anschließender Sequenzierung fortgefahren.

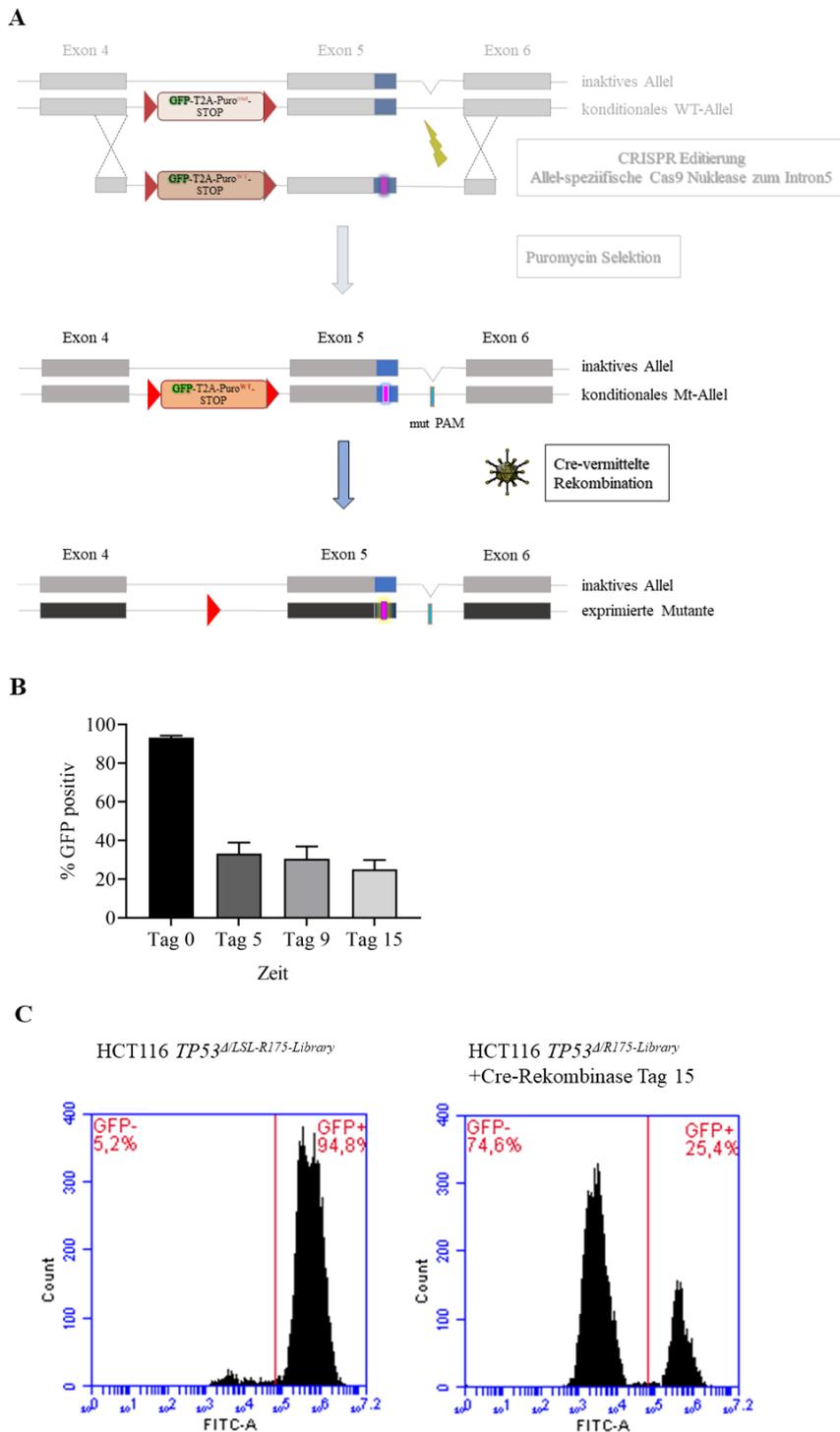


Abbildung 10: CRISPR Editierung des *TP53*-Gens in HCT116 Zellen und Cre-vermittelte Rekombination

(A) Schemazeichnung der CRISPR-Editierung, modifiziert nach freundlicherweise zur Verfügung gestellter Vorlage von Maria Klimovich. Der grau hinterlegte Teil zeigt die zuvor in der Arbeitsgruppe durchgeführte CRISPR Editierung der HCT116-Zelllinie. Der zweite Teil zeigt die Cre-vermittelte Rekombination und Entfernung der LSL-Kassette und damit des *GFP*-Gens. (B) Balkendiagramm der durchflusszytometrischen Messung des Anteils GFP-positiver Zellen im Zeitverlauf, x-Achse: Messung vor Infektion (Tag 0) und fünf, neun und 15 Tage nach der Infektion; y-Achse: Prozentsatz der GFP-positiven Zellen, die Daten zeigen den Mittelwert + Standardabweichung aus drei Replikaten. (C) Histogramme der durchflusszytometrischen Messungen des Anteils GFP-positiver Zellen vor und nach Cre-Rekombinase-Infektion

3.1.2. Analyse der proliferativen Fitness-Effekte von *TP53*^{R175}-

Mutationen unter MDM2-Inhibition

Die Zellen der HCT116 *TP53*^{Δ/R175-Library} wurden in drei unabhängigen Replikaten acht Tage lang mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin (2,5 – 20 μM) behandelt. Dadurch wurde der MDM2-vermittelte Abbau von p53 gestört und so Zellstress imitiert, der zur Akkumulation von p53 führt. Zellen mit WTp53 reagieren auf die Behandlung mit Nutlin mit Zellzyklusarrest und Apoptose, was sich hier in einer Depletion zeigen würde. Zellen mit LOF-Mutationen sind dazu nicht in der Lage und wären infolgedessen angereichert. pLOF-Mutationen führen zum teilweisen Verlust von p53-Funktionen, sodass in Folge der Nutlin-Behandlung die Zellen weder so stark depletiert wie die Zellen mit WTp53 noch so stark angereichert wären wie die Zellen mit LOF-Mutationen.

Nach Extraktion genomischer DNA und Durchführung einer *Nested* PCR erfolgte eine Hochdurchsatz-Sequenzierung. Zur Darstellung der Sequenzierungsergebnisse wurden Heatmaps verwendet. Die Farbskalierung erfolgte anhand des Fold change. Dieser stellt das Verhältnis eines relativen Wertes des Vorhandenseins einer Mutation nach einer medikamentösen Behandlung zum jeweiligen relativen Wert der Mutation in der unbehandelten Kontrolle dar. Zunächst wurden die Sequenzierungsergebnisse in alphabetischer Reihenfolge der Mutationen bzw. daraus folgenden Aminosäuren erstellt (s. Abbildung 11A und B). Nach der Behandlung mit Nutlin waren die Zellen mit den stillen Mutationen (R1, R2, R3), welche unterschiedliche Basensequenzen aufwiesen, aber für Arginin (R) kodierten, depletiert. Das spiegelt sich in einem Fold change kleiner 1 wider. Die Stop-Mutation, die Frameshift-Mutationen und die R175-Deletion bedingen einen p53-Funktionsverlust. Das zeigt sich in der nicht vorhandenen Fähigkeit zur Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest nach der Behandlung mit Nutlin, weshalb diese Mutationen stark angereichert waren (s. Abbildung 11A und B).

Die Medianwerte der Fold change Werte der drei Replikate nach Behandlung mit Nutlin in der Standardkonzentration von 10 μM wurden aufsteigend sortiert (Abbildung 11C) und als Wasserfalldiagramm dargestellt (Abbildung 11D). Die Mutationen, die die Aminosäureänderungen Threonin, Alanin, Cystein oder Valin bedingten und zur starken Verminderung dieser Zellen führten, können neben den stillen Mutationen als WT-like (WT-ähnlich) klassifiziert werden, da die Zellen durch die Behandlung mit Nutlin ähnlich stark depletiert waren. Die Mutationen, die dazu führten, dass die Zellen nach der Behandlung mit Nutlin Apoptose und Zellzyklusarrest nicht induzieren konnten und

angereichert waren, werden als LOF-Mutationen charakterisiert. Dazu gehören die Frameshift-Mutationen, die Stop-Mutation und die Deletion. Mutationen, die eine ähnlich starke Anreicherung der Zellen bewirkten, lassen sich folglich auch den LOF-Mutationen zuordnen. Mutationen, die weder zu einer Anreicherung noch zu einer Reduktion der Zellzahl geführt haben, können in die Gruppe der pLOF-Mutationen eingegliedert werden, wie beispielsweise Prolin. Diese Reihenfolge der Mutationen wurde in den Folgeexperimenten zur besseren Übersicht beibehalten.

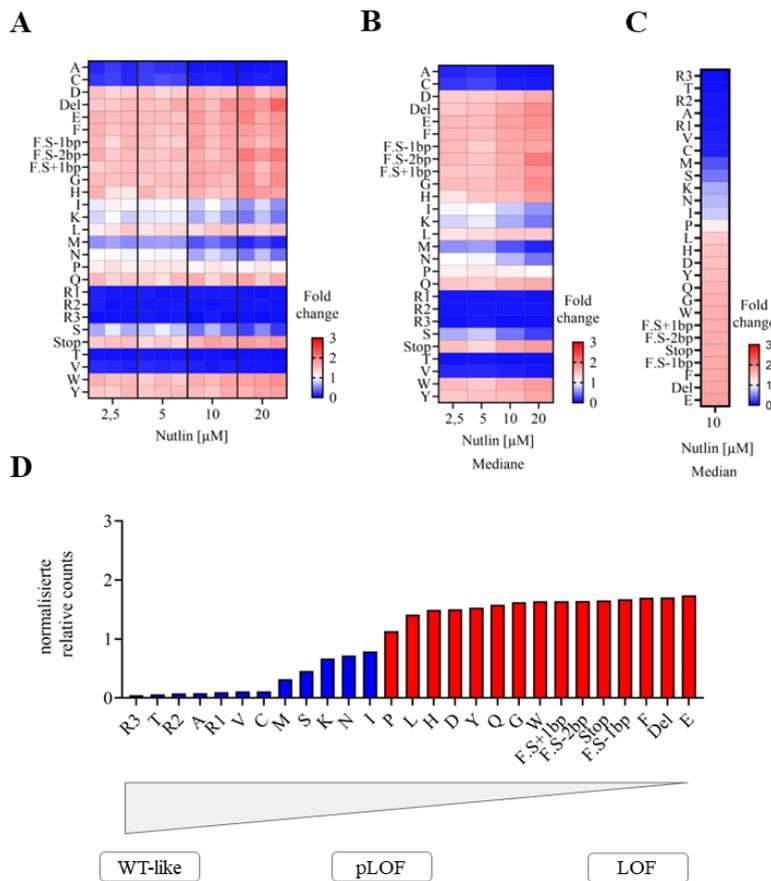


Abbildung 11: Fitness-Effekte von $TP53^{R175}$ -Mutationen unter MDM2-Inhibition

Die Zellen der HCT116 $TP53^{Δ/R175-Library}$ wurden acht Tage lang mit Nutlin (2,5 – 20 μM) behandelt.

(A) Heatmap der Fold change-Werte der Nutlin-Behandlung in Bezug zur unbehandelten Kontrolle in drei unabhängigen Replikaten, Experiment durchgeführt und die Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Maria Klimovich. y-Achse: Mutationen in alphabetischer Reihenfolge, x-Achse: verschiedene Nutlin- Konzentrationen. Die Legende zeigt die Repräsentation der Fold change Werte in Farbe. (B) y-Achse: Mutationen in alphabetischer Reihenfolge, x-Achse: Mediane der Werte in A. (C) Mutationen nach aufsteigenden Median-Werten des Fold change nach Behandlung mit 10 μM Nutlin sortiert von 0 (blau) nach 3 (rot). (D) Wasserfalldiagramm, y-Achse: Median-Werte des Fold change nach der Behandlung mit 10 μM Nutlin, x-Achse: Mutationen sortiert nach aufstiegenderem Fold change, blau: Fold change-Werte <1, rot: Fold change-Werte >1.

3.2. Analyse der proliferativen Fitness-Effekte von $TP53^{R175}$ -Mutationen in Nährstoffmangelzuständen

3.2.1. Fitness-Effekte von $TP53^{R175}$ -Mutationen unter HBSS

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) ist ein Puffer zur Stabilisierung der Zellen, mit dem biologische Medien nachgeahmt werden. Es ist für Nährstoffmangelstudien geeignet, da es nur essenzielle anorganische Ionen sowie Glukose in einer geringen Konzentration von 1 g/l enthält. Durch die fehlende Ergänzung von FBS wird eine nahezu vollständige Nährstoff- und Wachstumsfaktorabsenz erreicht und metabolischer Stress ausgelöst. Die HCT116 $TP53^{\Delta/R175}$ -Library-Zellen wurden in drei unabhängigen Replikaten für eine Dauer von drei Tagen in HBSS kultiviert. Da Zellen ohne Nährstoffzufuhr nicht lange überleben, wurde HBSS nach drei Tagen entfernt und die Zellen weitere sieben Tage in vollständigem DMEM kultiviert, um die überlebenden Zellen zu vermehren. Anschließend erfolgte die Extraktion der gDNA, Amplifizierung mittels *Nested PCR* und darauffolgender Sequenzierung der Amplikons. Zur Berechnung der Fold change-Werte dienten Zellen, die durchgängig in vollständigem DMEM kultiviert wurden, als Kontrolle.

Abbildung 12 zeigt, dass die Zellen mit den stillen und den zuvor als WT-like-Mutationen klassifizierten Zellen am stärksten depletiert waren. Alle anderen pLOF- und LOF-Mutationen führten im Vergleich dazu zu einer geringfügigen Anreicherung. Somit bedingten pLOF- und LOF-Mutationen eine höhere proliferative Fitness gegenüber Zellen mit stillen Mutationen und WTp53-Expression unter HBSS. Es ergaben sich jedoch keine großen Unterschiede zwischen pLOF- und LOF-Mutationen.

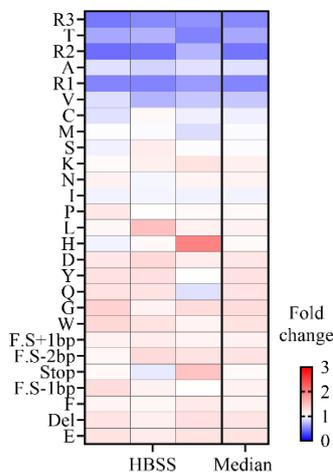


Abbildung 12: Fitness-Effekte von $TP53^{R175}$ -Mutationen unter HBSS

Heatmap der Fold change Werte der drei Replikate in Bezug zur Kontrolle und deren Median nach Kultivierung der HCT116 $TP53^{A/R175}$ -Library in HBSS für drei Tage und anschließend in vollständigem DMEM für weitere sieben Tage. Die Legende zeigt die Repräsentation der Fold change Werte in Farbe.

3.2.2. Fitness-Effekte von $TP53^{R175}$ -Mutationen unter Glukoseentzug

Ein Aspekt des GOF von p53-Mutationen zeigt sich in metabolischen Veränderungen, z.B. in der Unterstützung des Warburg Effekts (Zhang et al., 2013). Es wurde deshalb untersucht, welche $TP53^{R175}$ -Mutationen zum Überleben der Zellen unter Glukoseentzug beitragen. Die Zellen wurden in glukose- und pyruvatfreiem Medium, welches mit dialysiertem FBS versetzt worden war, kultiviert, um einen Glukoseentzug zu erzeugen. Dialysiertes FBS wurde verwendet, da der Glukosegehalt <5 mg/dl beträgt, aber die Zellen so trotzdem andere wichtige Wachstumsfaktoren erhielten, um Verfälschungen durch das Serum auszuschließen. Als Kontrolle diente DMEM mit einer Glukosekonzentration von 4,5 g/l (25 mM), versetzt mit 10 % dialysiertem FBS. Da in den HCT116 $TP53^{A/R175}$ -Library-Zellen p53 nur von einem Allel exprimiert wird, wurden die Zellen zusätzlich zum Glukoseentzug mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin in niedriger Konzentration (2,5 μ M) behandelt, um p53 zu stabilisieren. Bereits nach 24 Stunden war die Zellproliferation der Zellen unter Glukoseentzug ohne sowie mit kombinierter Nutlin-Behandlung in erheblichem Maße beeinträchtigt. Deshalb wurde ein Mediumwechsel zu vollständigem DMEM durchgeführt, damit alle Zellen weitere 24 Stunden in DMEM ohne jeglichen Nährstoffmangel oder eine Behandlung proliferieren konnten (s. Abbildung 13A). Nachdem die gDNA extrahiert und die *Nested* PCR durchgeführt worden war, wurden die Amplikons sequenziert. Zur Berechnung der Fold change-Werte wurde die unbehandelte Kontrolle (Kultivierung in DMEM) verwendet. Um den Effekt von Nutlin bei der Kombination aus Glukosemangel und Nutlin-Behandlung herauszurechnen, erfolgte die Normalisierung auf die isolierte Nutlin-Behandlung.

Wie bereits zuvor beschrieben, führte die Behandlung mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin zur Depletion der Zellen mit stillen p53-Mutationen sowie WT-like-Mutationen (s. Abbildung 13B). Glukoseentzug führte zu einer ähnlichen Verteilung der Fold change-Werte. LOF- und pLOF-Mutationen führten zu einer geringfügigen Anreicherung. Lediglich Zellen mit der p53R175Q-Mutation waren im Median depletiert, was unter der Behandlung mit Nutlin nicht der Fall war. Besonders bei Betrachtung der Medianwerte der Fold change-Werte der einzelnen Bedingungen fällt auf, dass die Kombination aus

Glukoseentzug und MDM2-Inhibitor-Behandlung die Depletion der Zellen mit stillen Mutationen von p53 und WT-like-Mutationen verstärkte (s. Abbildung 13C). Die Normalisierung der Kombination aus Glukoseentzug und Behandlung mit Nutlin auf die alleinige Nutlin-Behandlung in Abbildung 13D bestätigt das. Stille Mutationen und WT-like Mutationen waren stärker depletiert als unter alleiniger Nutlin-Anwendung. Zusammengefasst bedingten LOF-Mutationen unter absolutem Glukoseentzug eine höhere proliferative Fitness als WTp53.

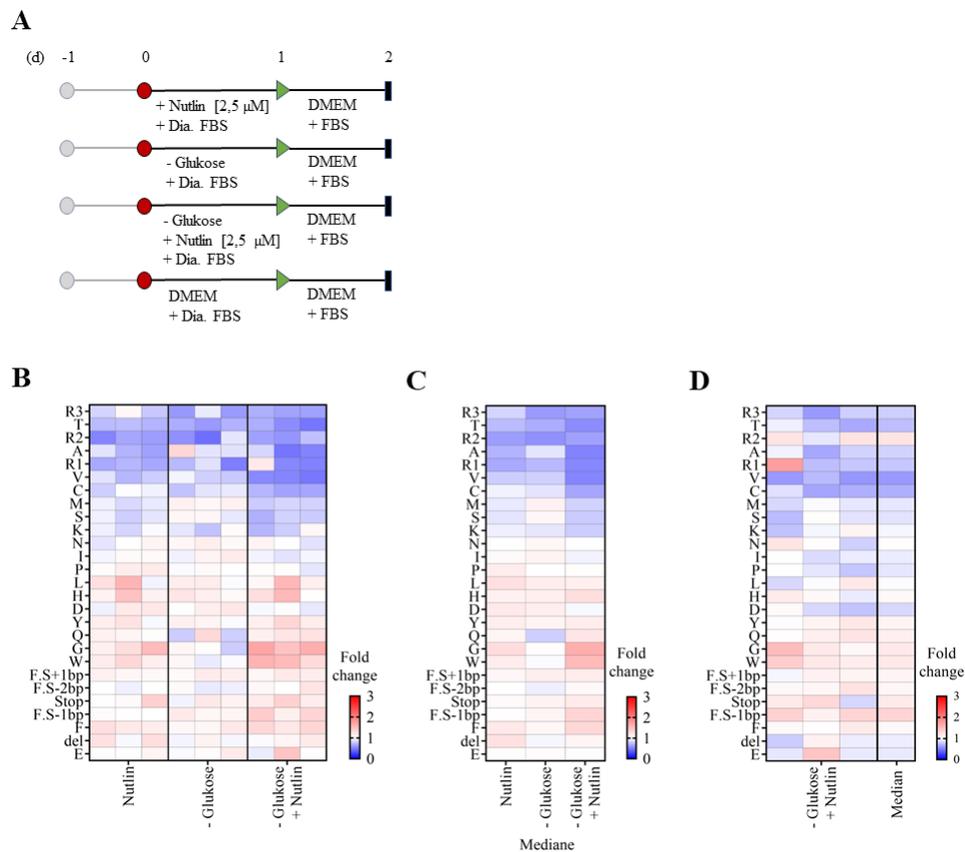


Abbildung 13: Fitness-Effekte von $TP53^{R175}$ -Mutationen unter Glukoseentzug

(A) Schematische Darstellung des Glukoseentzugs und der Behandlung mit 2,5 µM Nutlin, Kreis (grau): Aussaat der Zellen, Kreis (rot): Beginn der Behandlung bzw. des Glukoseentzugs, Pfeil (grün): Wechsel zu vollständigem DMEM, Balken (schwarz): Ernte der Zellen. (B) Heatmap der Fold change Werte von drei unabhängigen Replikaten normalisiert auf die Kontrolle mit DMEM mit 25 mM Glukose und dialysiertem FBS. Die Legende zeigt die Repräsentation der Fold change-Werte in Farbe. (C) Heatmap der Mediane der Fold change Werte aus B. (D) Heatmap der Fold change Werte der Bedingung Glukoseentzug und Behandlung mit Nutlin normalisiert auf die Behandlung mit Nutlin als Kontrolle und deren Median.

3.2.3. Fitness-Effekte von $TP53^{R175}$ -Mutationen unter Glutaminentzug

Aufgrund der Tatsache, dass p53 auch eine wichtige Rolle im Glutaminstoffwechsel von Tumorzellen spielt, wurde der Einfluss von $TP53^{R175}$ -Mutationen auf die Überlebens-

fähigkeit der Zellen unter Glutaminentzug untersucht. Die HCT116 *TP53^{A/R175-Library}*-Zellen wurden in glutaminfreiem DMEM kultiviert. Dieses wurde zum Ausschluss von Verzerrungen durch das Serum mit 10 % dialysiertem FBS versetzt, da dialysiertes Serum frei von Aminosäuren ist. Im ersten Ansatz (s. Abbildung 14A) wurden unterschiedlich lange Zeiträume von Glutaminmangelzuständen und ein möglicher Einfluss eines anschließenden Mediumwechsels zu vollständigem DMEM untersucht. Jede Bedingung wurde in drei unabhängigen Replikaten durchgeführt. Im Anschluss an die Extraktion der gDNA folgte eine *Nested* PCR und Sequenzierung. Als Kontrolle zur Berechnung der Fold change-Werte diente jeweils die parallel durchgeführte Kultivierung der Zellen in DMEM mit einer Glutaminkonzentration von 4 mM und 10 % dialysiertem FBS. Dies wurde für jede Bedingung mit derselben Zeitdauer durchgeführt, inklusive des Mediumwechsels zu vollständigem DMEM (s. Abbildung 14A).

Abbildung 14B zeigt, dass stille Mutationen und WT-like-Mutationen zu einer Depletion der Zellen bereits nach drei Tagen Glutaminentzug geführt haben. LOF-Mutationen bedingten eine Anreicherung der Zellen. Ein Mediumwechsel zu vollständigem DMEM nach ebenfalls drei Tagen Glutaminentzug führte nicht zu einer deutlichen Veränderung der Fold-change Werte der Mutationen. Nach sieben Tagen Glutaminentzug waren die Effekte der Mutationen deutlicher zu sehen. Stille Mutationen und WT-like Mutationen waren stärker depletiert und LOF-Mutationen angereichert. Abbildung 14C verdeutlicht, dass der Mediumwechsel nach drei Tagen Glutaminentzug keinen bedeutenden Einfluss auf die Medianwerte der Fold change-Werte hatte. Je länger der Glutaminentzug andauerte, desto stärker waren die Effekte der Mutationen auf die proliferative Fitness zu sehen: Zellen mit stillen und WT-like Mutationen waren depletiert. LOF-Mutationen steigerten hingegen die proliferative Fitness der Zellen.

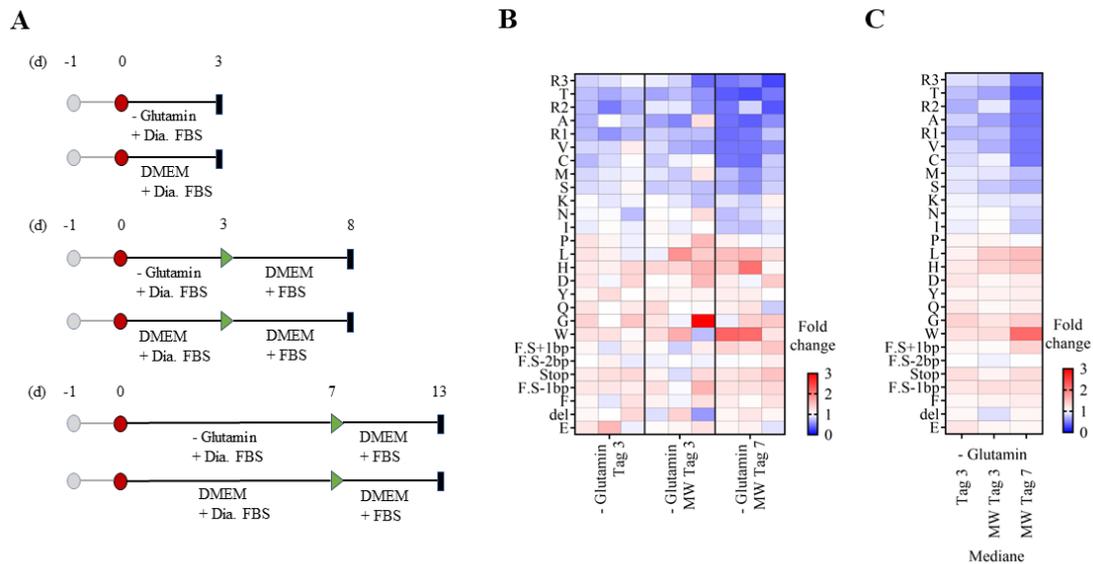


Abbildung 14: Fitness-Effekte von $TP53^{R175}$ -Mutationen unter Glutaminentzug
 (A) Schematische Darstellung des Glutaminentzugs, Kreis (grau): Aussaat der Zellen, Kreis (rot): Beginn der Behandlung bzw. des Glutaminentzugs, Pfeil (grün): Wechsel zu vollständigem DMEM, Balken (schwarz): Ernte der Zellen. (B) Heatmap der Fold change Werte von drei unabhängigen Replikaten normalisiert auf die Kontrolle mit DMEM und dialysiertem FBS, y-Achse: Mutationen in der Reihenfolge aus Abbildung 11D, x-Achse: unterschiedliche Glutaminentzugsdauern, die Legende zeigt die Repräsentation der Fold change Werte in Farbe. (C) Heatmap der Mediane der Fold change-Werte aus B.

3.3. Analyse des GOF-Effekts von $TP53^{R175}$ -Mutationen in Bezug auf p73

Ein Aspekt des GOF von p53-Mutationen ist die Inhibition des zur p53-Familie gehörenden Tumorsuppressors p73 (Brosh and Rotter, 2009). Diese würde sich in einer verminderten p73-vermittelten Aktivierung der Transkription apoptotischer und zellzyklusarretierender Gene und deshalb höheren Proliferationskapazität der Zellen zeigen. Um zu untersuchen, welche $TP53^{R175}$ -Mutationen möglicherweise einen GOF hinsichtlich der Inhibition von p73 aufweisen, erfolgte die Doxycyclin-abhängige Überexpression von TAp73 α und TAp73 β in den HCT116 $TP53^{\Delta/R175}$ -Library-Zellen. Ein die Gene für TAp73 α und TAp73 β enthaltender pInducer20-Vektor wurde lentiviral in die HCT116 $TP53^{\Delta/LSL}$ -Zellen transduziert. Nach der Generierung und Auswahl geeigneter Einzelzellklone erfolgte die Transfektion der $TP53^{R175}$ -Library und eine adenovirale Cre-Rekombinase Infektion zur Entfernung der LSL-Kassette. Es wurden verschiedene Kombinationen aus Doxycyclin-Behandlung zur Überexpression von TAp73 α und TAp73 β und Nutlin-Behandlung zur MDM2-Inhibition mit daraus folgender p53-Stabilisierung durchgeführt. Anschließend wurde gDNA extrahiert, diese

durch *Nested* PCR amplifiziert, die Amplikons sequenziert und die Fold change-Werte berechnet.

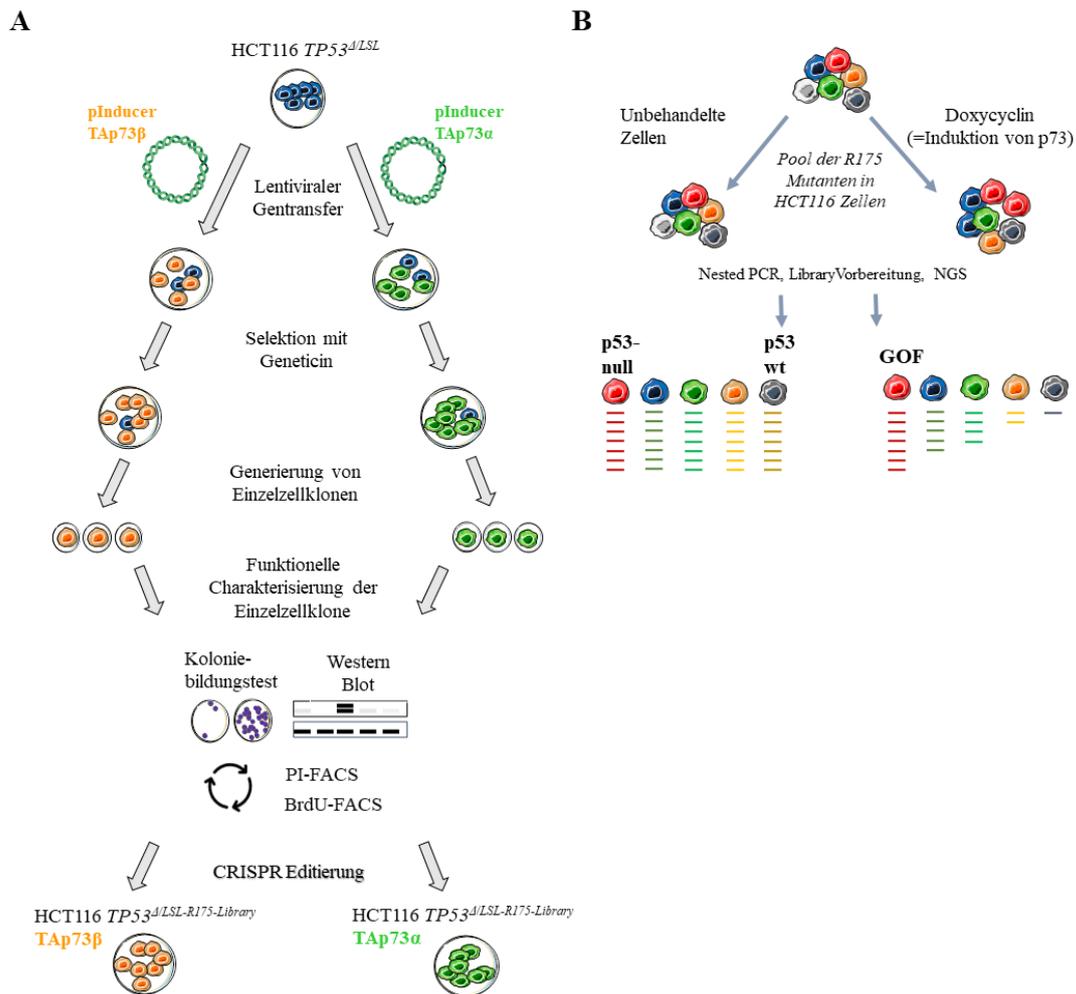


Abbildung 15: Experimentelles Procedere zur Analyse des GOF-Effekts von $TP53^{R175}$ -Mutationen in Bezug auf p73

(A) Übersicht des Vorgehens vom lentiviralen Gentransfer bis zur CRISPR-Editierung der $TP53^{R175}$ -Library. (B) Übersicht der Analyse eines möglichen GOF-Effekts der $TP53^{R175}$ -Mutationen, modifiziert nach freundlicherweise zur Verfügung gestellten Vorlage von Maria Klimovich. Die Abbildung wurde teilweise mit Servier Medical Art erstellt, bereitgestellt von Servier, lizenziert unter einer Creative Commons Attribution 3.0 (Servier Medical Art, 2022).

3.3.1. Doxycyclin-abhängige Expression von TAp73 in polyklonalen HCT116 $TP53^{Δ/LSL}$ -Zelllinien

Mithilfe von HEK-293T-Zellen wurden Lentiviren mit der Calciumphosphatmethode hergestellt. Die lentiviralen Vektoren beinhalteten entweder pInducer20-TAp73α oder pInducer20-TAp73β, welche in HCT116 $TP53^{Δ/LSL}$ -Zellen transduziert wurden. Aufgrund der apoptotischen und zellzyklusarretierenden Wirkung von TAp73α und TAp73β sollte deren Überexpression steuerbar sein. Deshalb wurde der pInducer20-

Vektor verwendet, um die Expression durch Behandlung mit Doxycyclin induzierbar zu machen. Nach dem lentiviralen Gentransfer wurde eine Selektion mit Geneticin durchgeführt. Anschließend wurde überprüft, ob p73 nachweisbar exprimiert und die Proliferationskapazität dadurch eingeschränkt wurde.

Der Koloniebildungstest in Abbildung 16A zeigt die eingeschränkte Proliferationskapazität der Zellen nach der Behandlung mit Doxycyclin. Durch die Doxycyclin-vermittelte Expression von TAp73 α und TAp73 β sind nach acht Tagen deutlich weniger Zellen auf der Zellkulturschale zu sehen als in der unbehandelten Kontrolle. In der nicht transduzierten Kontrolle der HCT116 *TP53^{A/LSL}*-Zelllinie bewirkte Doxycyclin keine Beeinträchtigung der Proliferationskapazität und dadurch keine verminderte Koloniebildung. Im Western Blot (s. Abbildung 16B) zeigte sich eine p73-Expression sowohl in der polyklonalen HCT116 *TP53^{A/LSL}* TAp73 α - als auch der polyklonalen HCT116 *TP53^{A/LSL}* TAp73 β -Zelllinie. Da TAp73 β ein kürzeres und damit leichteres Protein als TAp73 α ist, lief es in der Gelelektrophorese weiter. Die p73-Bande wurde mit länger andauernder Doxycyclin-Behandlung schwächer.

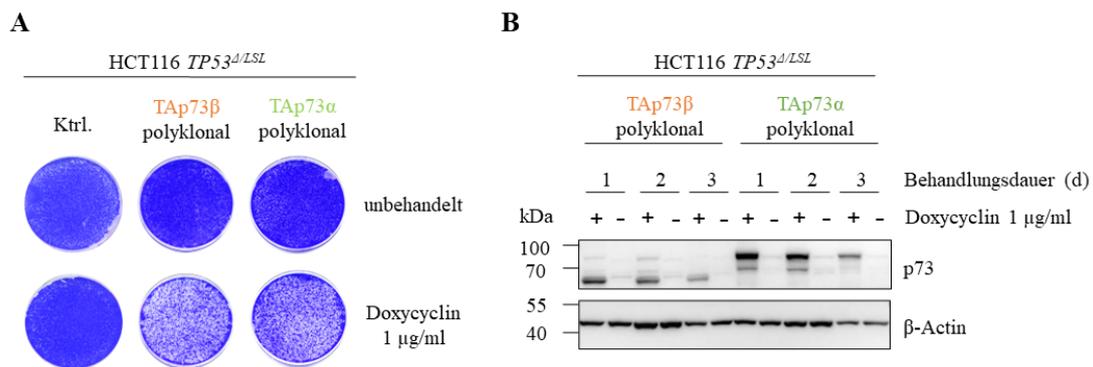


Abbildung 16: Nachweis der Doxycyclin-induzierten Expression von TAp73
(A) Koloniebildungstest der polyklonalen HCT116 *TP53^{A/LSL}* TAp73-Zelllinien und nicht transduzierter Kontrolle nach Behandlung mit Doxycyclin für acht Tage und unbehandelter Kontrolle. **(B)** Western Blot der polyklonalen HCT116 *TP53^{A/LSL}* TAp73-Zelllinien nach Behandlung mit Doxycyclin mit unterschiedlicher Behandlungsdauer, β -Actin diente als Ladekontrolle.

3.3.2. Doxycyclin-abhängige Expression von TAp73 in HCT116 *TP53^{A/LSL}* TAp73 Einzelzellklonen

Es ließ sich nicht überprüfen, ob jeder einzelnen HCT116 *TP53^{A/LSL}*-Zelle bei dem lentiviralen Transfer von pInducer20-TAp73 α und TAp73 β die gleiche Menge DNA transduziert wurde. Eine ungleiche TAp73-Transduktion würde in einer ungleichmäßigen Expression von p73 nach der Behandlung mit Doxycyclin resultieren. Dadurch wäre die

Stärke der Inhibition durch verschiedene MTP53-Proteine nicht vergleichbar. Um dem entgegenzuwirken, wurden HCT116 *TP53^{A/LSL}* TAp73 α und TAp73 β Einzelzellklone generiert. Anschließend wurde die Expression und Wirkung von p73 untersucht.

3.3.2.1. Einzelzellklone TAp73 α

Der Koloniebildungstest in Abbildung 17A stellt die Wirkung des Doxycyclin-abhängig exprimierten p73 dar, indem weniger Zellkolonien auf den Schalen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und damit eine Proliferationsinhibition zu sehen ist. In der Kontrolle der HCT116 *TP53^{A/LSL}*-Zelllinie bewirkte Doxycyclin keine Beeinträchtigung der Proliferationskapazität und dadurch keine verminderte Koloniebildung. Für die Klone #3, #4 und #5 wurde eine deutlich verminderte Zellzahl ermittelt, wovon #3 die stärkste Reduktion aufwies, was auf eine starke Aktivität von p73 zurückzuführen ist.

Die Untersuchung der Expression von p73 nach zweitägiger Behandlung mit Doxycyclin in den HCT116 *TP53^{A/LSL}* TAp73 α Einzelzellklonen erfolgte mittels Western Blot. Dieser zeigt, dass die Klone #2 bis #5 nach Behandlung mit Doxycyclin eine Expression von p73 aufwiesen (s. Abbildung 17A). Klon #1 zeigte keine durch Doxycyclin-induzierbare p73-Expression. Für Klon #4 wurde die stärkste Expression detektiert.

Obwohl im Western Blot eine p73-Expression im Klon #2 nach der Behandlung mit Doxycyclin nachgewiesen wurde, konnte im Koloniebildungstest keine Proliferationshemmung festgestellt werden.

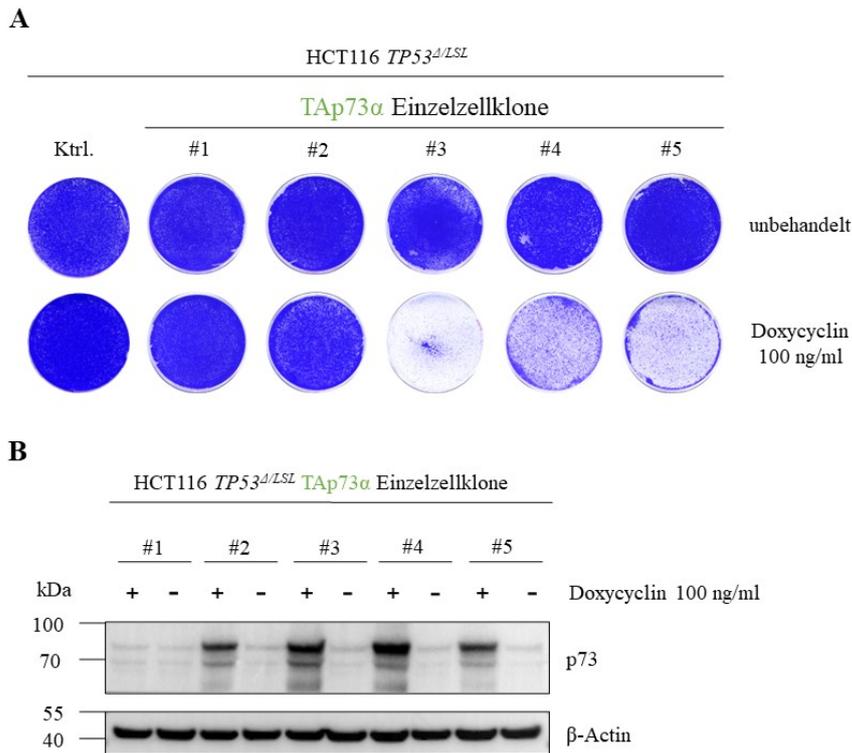


Abbildung 17: Nachweis der Doxycyclin-induzierten Expression von TAp73α in Einzelzellklonen
(A) Koloniebildungstest der fünf Einzelzellklone sowie der HCT116 *TP53^{Δ/LSL}*-Zellen nach Behandlung mit Doxycyclin für acht Tage und unbehandelter Kontrolle **(B)** Western Blot von fünf Einzelzellklonen zum Nachweis der p73 Expression nach zwei Tagen Behandlung mit Doxycyclin, β-Actin diente als Ladekontrolle.

3.3.2.2. Einzelzellklone TAp73β

Im Koloniebildungstest (s. Abbildung 18A) ist die nach Doxycyclin-Behandlung p73-vermittelte Proliferationsinhibition und daraus resultierend eine verminderte Zellkoloniezahl für die Klone #1, #2, #3 und #5 zu sehen. #4 zeigte keinen und #1 den geringsten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. Die Proliferation der Kontrollzelllinie HCT116 *TP53^{Δ/LSL}* wurde durch Doxycyclin nicht beeinträchtigt.

Im Western Blot (s. Abbildung 18B) wurde eine Doxycyclin-induzierte Expression von p73 der fünf HCT116 *TP53^{Δ/LSL}* TAp73β Zellklone detektiert. Des Weiteren zeigte Klon #2 drei Banden. Klon #5 wies eine stärkere Expression von p73 als die anderen Klone auf.

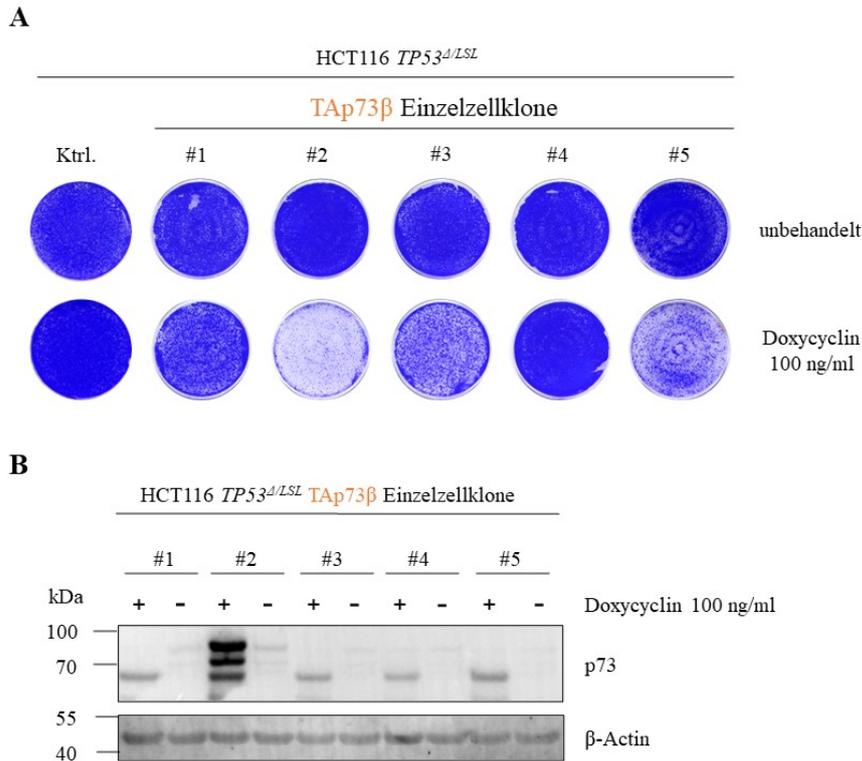


Abbildung 18: Nachweis der Doxycyclin-induzierten Expression von TAp73β in Einzelzellklonen
(A) Koloniebildungstest der fünf Einzelzellklone sowie der HCT116 *TP53^{Δ/LSL}*-Zellen nach Behandlung mit Doxycyclin für acht Tage und unbehandelter Kontrolle. Die Kontrolle der HCT116 *TP53^{Δ/LSL}*-Zellen entspricht derselben Kontrolle aus Abbildung 17A. **(B)** Western Blot von fünf Einzelzellklonen zum Nachweis der p73 Expression nach Behandlung mit Doxycyclin für zwei Tage und unbehandelter Kontrolle, β-Actin diene als Ladekontrolle.

3.3.3. Funktionelle Charakterisierung der HCT116 *TP53^{Δ/LSL}*

TAp73 Einzelzellklone

Um zu eruieren, welche Klone jeweils am besten für die Analyse des Effekts der *TP53^{R175}*-Mutationen auf p73 geeignet sind, war es wichtig, neben der Expression von p73 im Western Blot und der sichtbaren Proliferationshemmung im Koloniebildungstest zu untersuchen, worauf dieser Effekt zurückzuführen ist.

Um p73-vermittelte Apoptose und den Zellzyklusarrest zu messen, wurden PI-FACS-Analysen der Einzelzellklone und anschließend eine BrdU-Zellzyklus-Analyse für einen ausgewählten Klon durchgeführt

3.3.3.1. Einzelzellklone TAp73α

Da im Koloniebildungstest in Abbildung 17 ein Doxycyclin-vermittelter Effekt hinsichtlich der Proliferationsinhibition nur für die Klone #3, #4 und #5 zu erkennen ist, wurden diese weiter mit einer PI-FACS Analyse untersucht. Diese wurde im Zeitverlauf

über fünf Tage durchgeführt, weil durch die p73-vermittelte Apoptose TAp73 α -exprimierende Zellen absterben und die Überreste nach einiger Zeit nur noch als Zelldebris zu sehen sind und im PI-FACS nicht erfasst werden. Abbildung 19A demonstriert, dass durch die Behandlung mit Doxycyclin und daraus folgender Expression von p73 nach drei und vier Tagen der Anteil der subG1-Zellen signifikant ansteigt. Klon #5 zeigte im gesamten Zeitverlauf die geringste Apoptose. Für die Klone #3 und #4 konnte besonders nach drei bis fünf Tagen signifikant verstärkt Apoptose nachgewiesen werden.

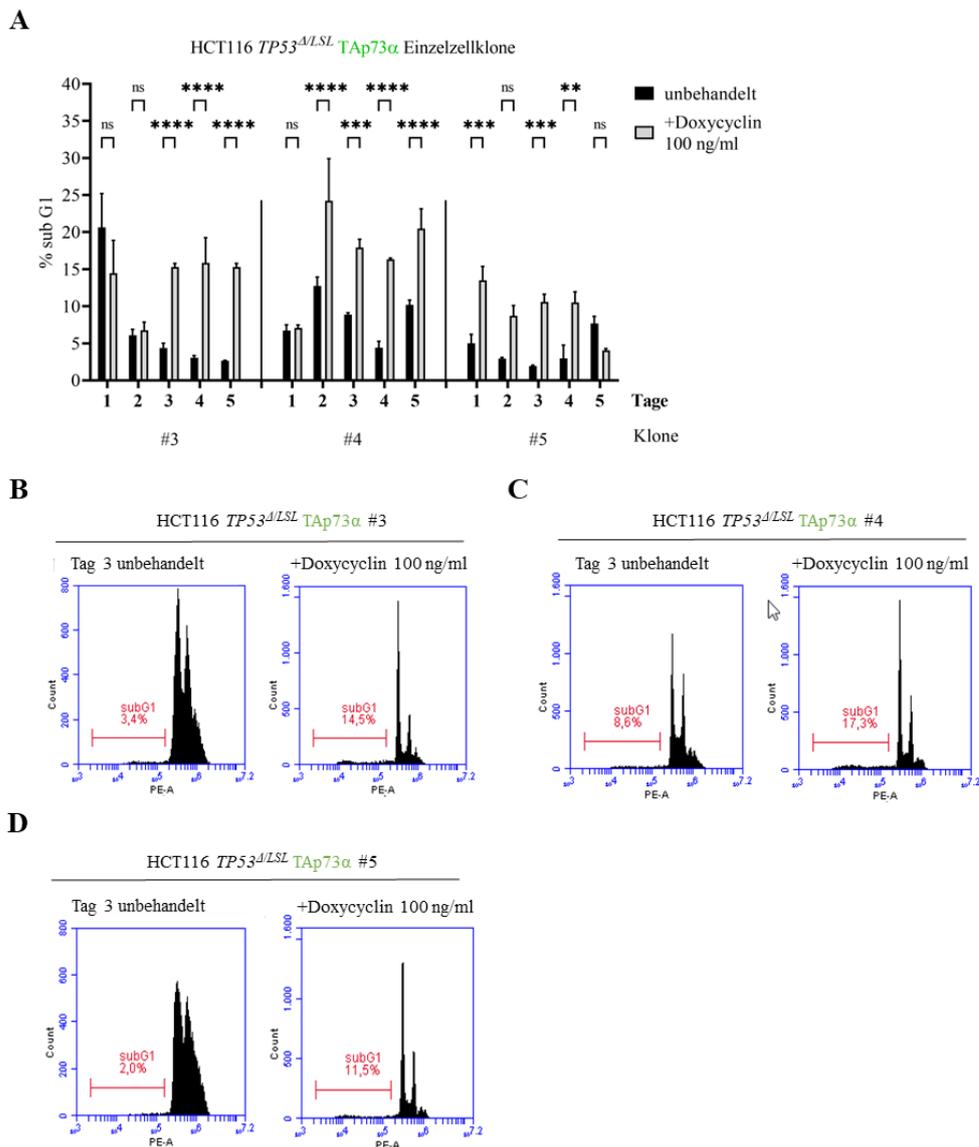


Abbildung 19: p73- vermittelte Apoptose in HCT116 *TP53^{d/LSL}* TAp73 α Einzelzellklonen
 (A) PI-FACS der Einzelzellklone #3 bis #5 nach unterschiedlicher Behandlungsdauer mit Doxycyclin. Auf der x-Achse sind die Einzelzellklone durch Balken getrennt, aufgetragen, auf der y-Achse ist der subG1- Anteil in % aufgetragen. Die Daten zeigen den Mittelwert + Standardabweichung aus drei Experimenten. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, Zweifaktorielle ANOVA+Posthoc-Test nach Tukey. (B) subG1-Histogramme von HCT116 *TP53^{d/LSL}* TAp73 α #3 an Tag 3 unbehandelt und mit Doxycyclin-Behandlung (100 ng/ml). (C) subG1-Histogramme von HCT116 *TP53^{d/LSL}* TAp73 α #4 an Tag 3 unbehandelt und mit Doxycyclin-Behandlung (100 ng/ml). (D) subG1-Histogramme von HCT116 *TP53^{d/LSL}* TAp73 α #5 an Tag 3 unbehandelt und mit Doxycyclin-Behandlung (100 ng/ml).

Anschließend wurde Klon #3 bestimmt (s. Tabelle 25), um mittels BrdU-FACS festzustellen, ob neben Apoptose auch ein p73-vermittelter Zellzyklusarrest in der S-Phase zu sehen ist. Abbildung 20A zeigt, dass im Vergleich zur Kontrolle ein signifikanter p73-vermittelter Arrest zu erkennen war. Der G1-Anteil der Zellen war höher. Hingegen wurde nach drei, vier und fünf Tagen eine Reduktion der sich in der S-

Phase befindenden Zellen von 20 % detektiert (s. Abbildung 20B). Abbildung 20C zeigt das Histogramm des BrdU-FACS eines Replikats an Tag 3. Auch hier ist die Reduktion des S-Phasen-Anteils sowie die Zunahme des G1-Phasen-Anteils zu erkennen.

Nach Betrachtung aller Ergebnisse wurde entschieden, Klon #3 auszuwählen, um den Effekt der *TP53^{R175}*-Mutationen auf *TAp73 α* zu untersuchen: Im Western Blot war eine deutlich ausgeprägte Expression nachweisbar und der starke zellzyklusarretierende Effekt wie auch die nachgewiesene Apoptose stimmten mit der Proliferationshemmung im Koloniebildungstest überein.

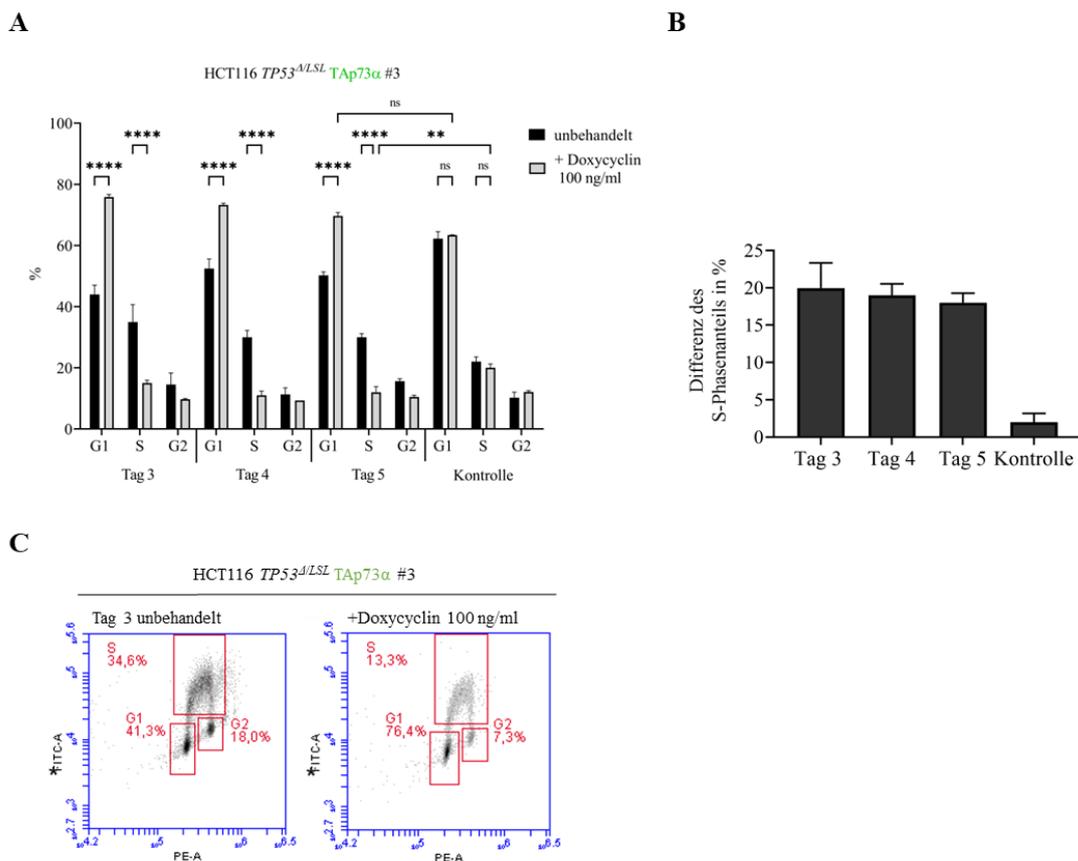


Abbildung 20: p73- vermittelter Zellzyklusarrest in HCT116 *TP53^{A/LSL}* TAp73 α Einzelzellklon #3 (A) BrdU-FACS nach unterschiedlicher Behandlungsdauer mit Doxycyclin. Auf der x-Achse sind die Zellzyklusphasen G1, S und G2 nach unterschiedlichen Behandlungsdauern und die untransduzierte Zelllinie HCT116 *TP53^{A/LSL}* an Tag 5 als Kontrolle aufgetragen. Die Daten zeigen den Mittelwert + Standardabweichung aus drei Experimenten. ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001, Zweifaktorielle ANOVA+Posthoc-Test nach Tukey. (B) Differenz des Anteils der Zellen in S-Phase (mit Doxycyclin behandelt – unbehandelt) aus A. (C) Histogramm des BrdU-FACS von einem Replikat HCT116 *TP53^{A/LSL}* TAp73 α #3 an Tag 3 unbehandelt und mit Doxycyclin 100 ng/ml behandelt.

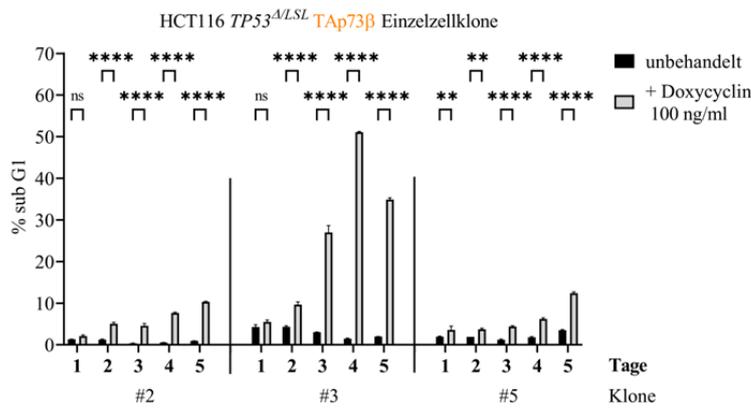
Tabelle 25: Zusammenfassung der Charakterisierung der HCT116 *TP53^{Δ/LSL}* TAp73α Einzelzellklone

| Klone | #1 | #2 | #3 | #4 | #5 |
|---------------------|------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|------------------|
| Western Blot | Keine Expression | Expression | Verstärkte Expression | Verstärkte Expression | Expression |
| Koloniebildungstest | Kein Effekt | Geringer Effekt | Stärkster Effekt | Effekt | Effekt |
| PI-FACS | - | - | Verstärkt Apoptose | Verstärkt Apoptose | Geringe Apoptose |
| BrdU-FACS | - | - | Zellzyklusarrest | - | - |

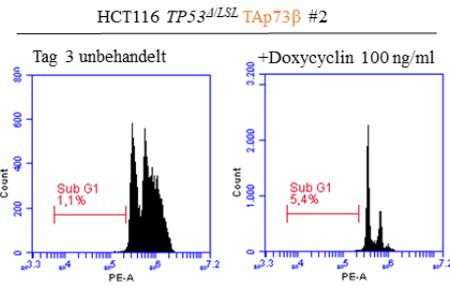
3.3.3.2. Einzelzellklone TAp73β

Zur Analyse der TAp73β-vermittelten Apoptose wurde ebenfalls eine PI-FACS-Analyse durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 21 dargestellt sind. Die Klone #1 und #4 zeigten nach Behandlung mit Doxycyclin keinen erhöhten subG1-Anteil, was mit dem Ergebnis des Koloniebildungstests übereinstimmt, in dem kein Unterschied nach der Behandlung mit Doxycyclin zu erkennen war. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die funktionelle Aktivität des im Western Blot nachgewiesenen p73 der Klone #1 und #4 unzureichend war. Die anderen Klone wurden mittels PI-FACS-Analyse im Zeitverlauf detaillierter untersucht (s. Abbildung 21B). Klon #3 zeigte am stärksten nach drei bis fünf Tagen eine p73-vermittelte Apoptose. Insgesamt ist die Apoptose deutlich höher als in den HCT116 *TP53^{Δ/LSL}* TAp73α Einzelzellklonen, was zu der als höher beschriebenen apoptotischen Aktivität von p73β passt (Vikhreva et al., 2018).

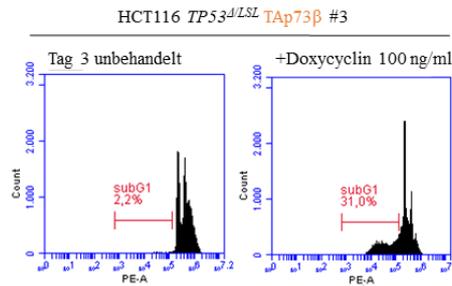
A



B



C



D

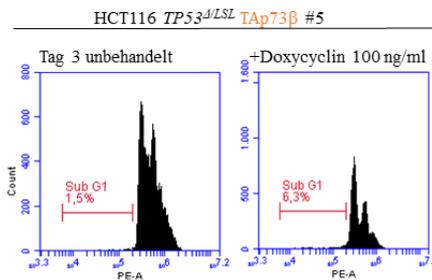


Abbildung 21: p73- vermittelte Apoptose in HCT116 *TP53^{Δ/LSL} TAp73β* Einzelzellklonen
 (A) PI-FACS der Einzelzellklone #2, #3 und #5 nach unterschiedlicher Behandlungsdauer mit Doxycyclin. Auf der x-Achse sind die Einzelzellklone, durch Balken getrennt, aufgetragen, auf der y-Achse ist der subG1-Anteil in % aufgetragen. Die Daten zeigen den Mittelwert + Standardabweichung aus drei Experimenten. ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001, Zweifaktorielle ANOVA+Posthoc-Test nach Tukey. (B) subG1-Histogramme von HCT116 *TP53^{Δ/LSL} TAp73β* #2 an Tag 3 unbehandelt und mit Doxycyclin-Behandlung (100 ng/ml). (C) subG1-Histogramme von HCT116 *TP53^{Δ/LSL} TAp73β* #3 an Tag 3 unbehandelt und mit Doxycyclin-Behandlung (100 ng/ml). (D) subG1-Histogramme von HCT116 *TP53^{Δ/LSL} TAp73β* #5 an Tag 3 unbehandelt und mit Doxycyclin-Behandlung (100 ng/ml).

Nach Zusammenfassung der Ergebnisse (s. Tabelle 26) wurde Klon #3 zur Untersuchung des Zellzyklusarrests mittels BrdU-FACS ausgewählt. Abbildung 22A zeigt nach drei Tagen einen signifikanten Zellzyklusarrest, welcher nach vier bis fünf Tagen geringer ausfiel (s. Abbildung 22B), was auf die zuvor gesehene starke apoptotische Aktivität zurückzuführen ist. Die Zunahme des G1-Phasen-Anteils sowie die Reduktion des S-

Phasen-Anteils ist ebenfalls beispielhaft im Histogramm des BrdU-FACS eines Replikats an Tag 3 zu erkennen (s. Abbildung 22C).

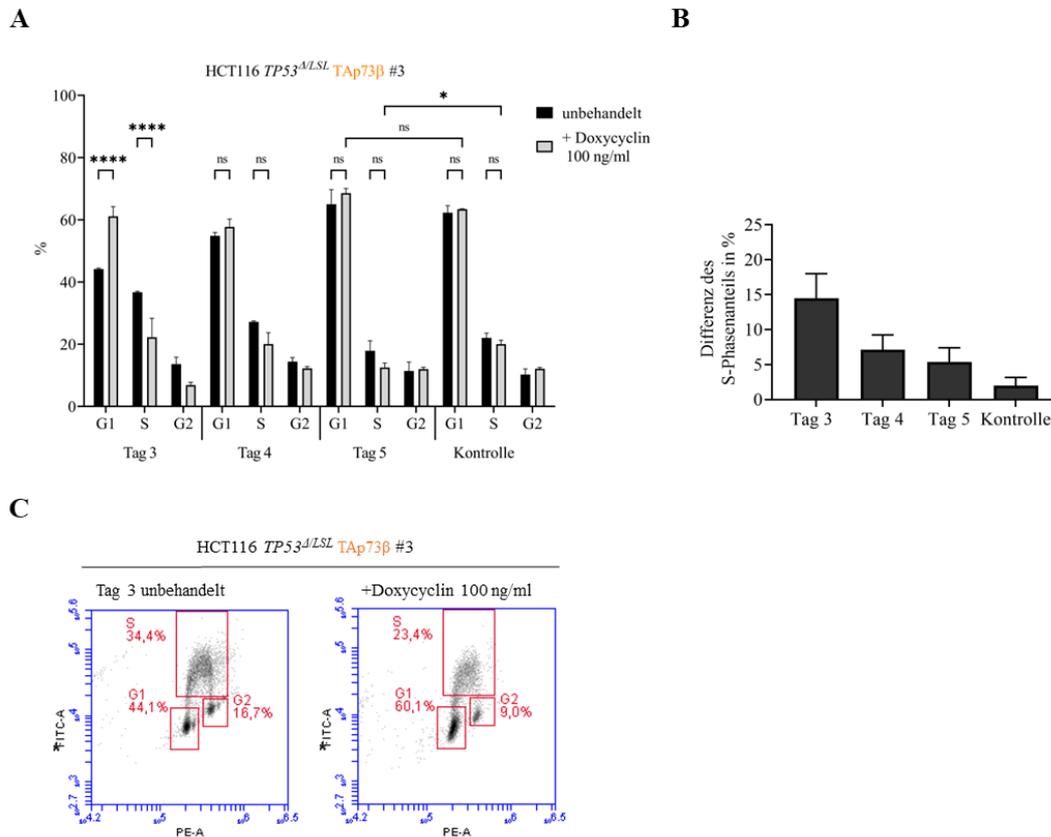


Abbildung 22: p73- vermittelter Zellzyklusarrest in HCT116 *TP53^{Δ/LSL}* TAp73β Einzelzellklon #3 (A) BrdU-FACS nach unterschiedlicher Behandlungsdauer mit Doxycyclin. Auf der x-Achse sind die Zellzyklusphasen G1, S und G2 nach unterschiedlichen Behandlungsdauern und die untransduzierte Zelllinie HCT116 *TP53^{Δ/LSL}* an Tag 5 als Kontrolle aufgetragen (gleiche Kontrolle wie in Abbildung 20). Die Daten zeigen den Mittelwert + Standardabweichung aus drei Experimenten. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$, Zweifaktorielle ANOVA+Posthoc-Test nach Tukey. (B) Differenz des Anteils der Zellen in S-Phase (mit Doxycyclin behandelt – unbehandelt) aus A. (C) Histogramm des BrdU-FACS von einem Replikat HCT116 *TP53^{Δ/LSL}* TAp73β #3 an Tag 3 unbehandelt und mit Doxycyclin 100 ng/ml behandelt.

Zur Analyse des Effekts der *TP53^{R175}*-Mutationen auf TAp73β wurde nach Berücksichtigung aller Ergebnisse Klon #3 ausgesucht: der Western Blot detektierte die Doxycyclin-vermittelte Expression und die TAp73β-vermittelte Wirkung im Hinblick auf Apoptose und Zellzyklusarrest war nachweisbar sowie im Koloniebildungstest zu sehen.

Tabelle 26: Zusammenfassung der Charakterisierung der HCT116 *TP53^{Δ/LSL}* TAp73β Einzelzellklone

| Klone | #1 | #2 | #3 | #4 | #5 |
|--------------------------|----------------|--|------------------------|----------------|---------------------|
| Western Blot | Expression | Expression + zwei weiterer Banden | Expression | Expression | Expression |
| Kolonie- bildungstest | Kein Effekt | Stärkster Effekt | Effekt | Kein Effekt | Effekt |
| PI-FACS | - | Apoptose | Am meisten Apoptose | - | Geringe Apoptose |
| BrdU- FACS | - | - | Zellzyklusarrest | - | - |

3.3.4. Integration der R175-Library in die HCT116 *TP53^{Δ/LSL}* TAp73 Einzelzellklone

Die Integration der *TP53^{R175}*-Mutationslibrary in die HCT116 *TP53^{Δ/LSL}* TAp73 Einzelzellklone erfolgte mittels CRISPR/Cas9 und HDR. Zunächst wurden die Zellen unter Verwendung von Lipofectamine mit einer sgRNA zum Intron 5 und der Reparaturvorlage cotransfiziert. Die Reparaturvorlage bestand aus einem Vektor mit den 27 verschiedenen *TP53^{R175}*-Mutationen, einem dem *TP53*-Gen homologen Segment von Exon 4 bis Exon 6 („Homologie-Arme“) einer mutierten PAM-Region und einer Stop-Kassette (LSL), welche die Gene *GFP* und *pac*, was die Puromycin-Resistenz generiert, enthielt (s. Abbildung 23A). Dass die HCT116 *TP53^{Δ/LSL}*-Zellen ein mutiertes *pac*-Gen in der LSL-Kassette enthielten, ermöglichte eine Selektion nach der Transfektion mittels Puromycin. Damit die Mutationen des durch die LSL-Kassette inaktivierten Allels exprimiert werden konnten, wurde die LSL-Kassette durch eine adenovirale Cre-Rekombinase Infektion entfernt. Der Erfolg dieser Rekombination konnte mittels durchflusszytometrischer GFP-Messungen überprüft werden, da mit der Entfernung der LSL-Kassette auch das *GFP*-Gen entfernt wurde.

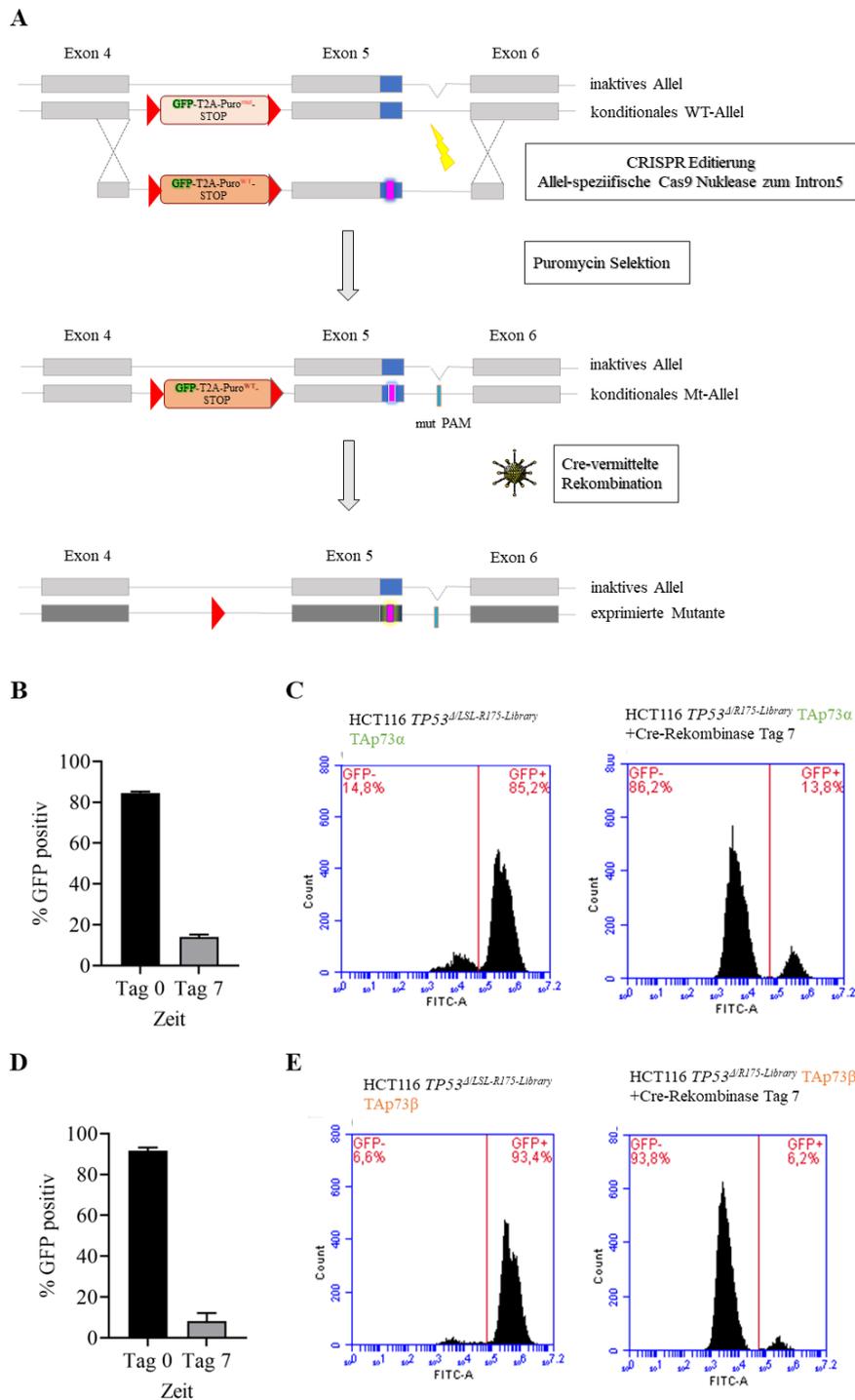


Abbildung 23: Integration der R175-Library in die HCT116 $TP53^{\Delta/LSL}$ TAp73 Einzelzellklone

(A) Schemazeichnung der CRISPR Editierung, modifiziert nach freundlicherweise zur Verfügung gestellten Vorlage von Maria Klimovich, (B) Balkendiagramm der durchflusszytometrischen Messung des Anteils GFP-positiver Zellen nach Cre-Rekombinase-Infektion der HCT116 $TP53^{\Delta/LSL-R175-Library}$ TAp73 α Zellen, x-Achse: Messung vor Infektion (Tag 0) und sieben Tage nach der Infektion; y-Achse: Prozentsatz der GFP-positiven Zellen, die Daten zeigen den Mittelwert + Standardabweichung aus drei Replikaten. (C) Histogramme der durchflusszytometrischen Messungen des Anteils GFP-positiver Zellen vor und nach Cre-Rekombinase-Infektion. (D) Balkendiagramm der durchflusszytometrischen Messung des Anteils GFP-positiver Zellen nach Cre-Rekombinase-Infektion der HCT116 $TP53^{\Delta/LSL-R175-Library}$ TAp73 β Zellen, x-Achse: Messung vor Infektion (Tag 0) sieben Tage nach der Infektion; y-Achse: Prozentsatz der GFP-positiven Zellen, die Daten zeigen den Mittelwert + Standardabweichung aus drei Replikaten. (E) Histogramme der durchflusszytometrischen Messungen des Anteils GFP-positiver Zellen vor und nach Cre-Rekombinase-Infektion

3.3.5. *TP53^{R175}*-Mutationen unter Expression von TAp73

Um zu untersuchen, ob bestimmte *TP53^{R175}*-Mutationen durch einen GOF-Effekt, indem sie den Tumorsuppressor TAp73 α hemmen, einen Überlebensvorteil haben, wurde TAp73 α Doxycyclin-abhängig überexprimiert. Die Expression von TAp73 α führte, wie in den Vorexperimenten gesehen, zu einer verminderten Zellzahl. Falls eine p53-Mutation zur Inhibition von TAp73 α führen würde, würde diese Mutante angereichert bzw. nicht depletiert erscheinen. Falls keine Mutation einen GOF in Bezug auf TAp73 α oder TAp73 β aufweisen würde, wäre die Verteilung der Mutationen unverändert.

3.3.5.1. *TP53^{R175}*-Mutationen unter Expression von TAp73 α

Durch eine Behandlung mit Doxycyclin für zehn Tage wurde TAp73 α überexprimiert. Parallel wurde die Behandlung mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin durchgeführt. Diese diente als Kontrolle, da bereits zuvor die HCT116 *TP53 ^{Δ /R175-Library}*-Zellen in verschiedenen Experimenten mit Nutlin behandelt wurden.

Die alleinige Behandlung mit dem MDM2-Inhibitor-Nutlin zeigte in der Zelllinie HCT116 *TP53 ^{Δ /LSL-R175-Library}* TAp73 α den zuvor in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Effekt: Stille und WT-like-Mutationen waren depletiert und pLOF- und LOF-Mutationen angereichert (s. Abbildung 24B). Durch die Behandlung mit Doxycyclin wurde TAp73 α exprimiert. Weder die einzelnen Replikate (s. Abbildung 24B) noch der Median (s. Abbildung 24C) zeigen eine Anreicherung einer Mutation über die der stillen Mutationen hinaus. Die meisten Mutationen waren leicht depletiert oder leicht angereichert

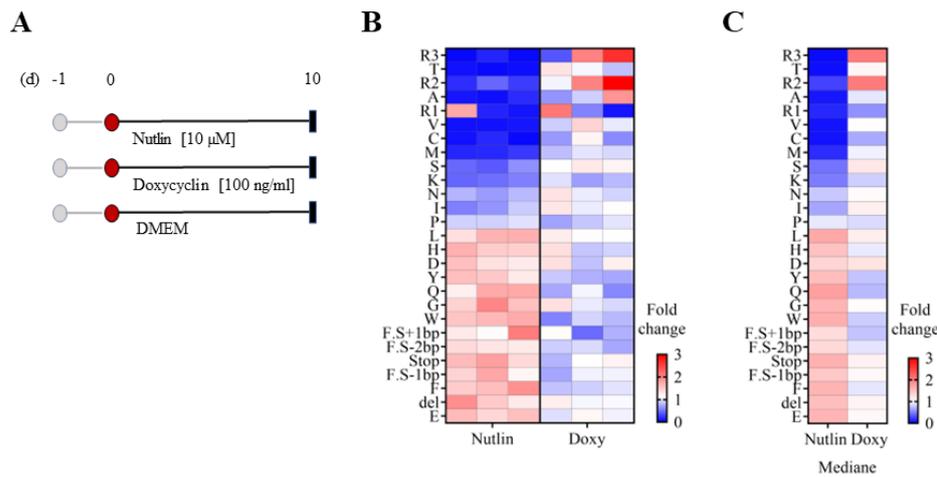


Abbildung 24: HCT116 $TP53^{\Delta/LSL-R175-Library}$ TAp73 α Behandlung mit Nutlin oder Doxycyclin
(A) Schematische Darstellung der Behandlung der Zellen, Kreis (grau): Aussaat der Zellen, Kreis (rot): Beginn der Behandlung mit Nutlin 10 μ M oder Doxycyclin 100 ng/ml, Balken (schwarz): Ernte der Zellen. **(B)** Heatmap der Fold change Werte von drei unabhängigen Replikaten nach der Behandlung mit Nutlin oder Doxycyclin für 10 Tage, Normalisierung auf die unbehandelte Kontrolle, y-Achse: Mutationen in der Reihenfolge aus Abbildung 11D, x-Achse: jeweilige Behandlung, die Legende zeigt die Repräsentation der Fold change Werte in Farbe. **(C)** Heatmap der Medianwerte der Fold change Werte aus A.

3.3.5.2. $TP53^{R175}$ -Mutationen unter Expression von TAp73 α und gleichzeitiger MDM2-Inhibition

Aufgrund der p53-Expression von nur einem Allel in den HCT116 $TP53^{\Delta/R175-Library}$ -Zellen erfolgte zusätzlich zur Behandlung mit Doxycyclin zur Stabilisierung von p53 eine gleichzeitige Behandlung mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin.

Abbildung 25B zeigt den Effekt der MDM2-Inhibition. Sowohl ohne als auch mit der Überexpression von TAp73 α waren die Zellen mit stillen und WT-like Mutationen depletiert und die Zellen mit LOF- und pLOF-Mutationen angereichert. Den Median in Abbildung 25C betrachtet ergab sich durch die Überexpression von TAp73 α durch die Behandlung mit Doxycyclin keine Änderung der Verteilung der Mutationen. Keine Mutation war in besonderem Maße angereichert. Zur isolierten Betrachtung des Einflusses der TAp73 α -Expression wurden die Werte der kombinierten Behandlung von Nutlin und Doxycyclin auf die alleinige Behandlung mit Nutlin normalisiert (s. Abbildung 25C und D). Die Replikate zeigten für einige Mutationen starke Schwankungen, jedoch wies auch hier im Median betrachtet keine Mutation eine starke Anreicherung auf.

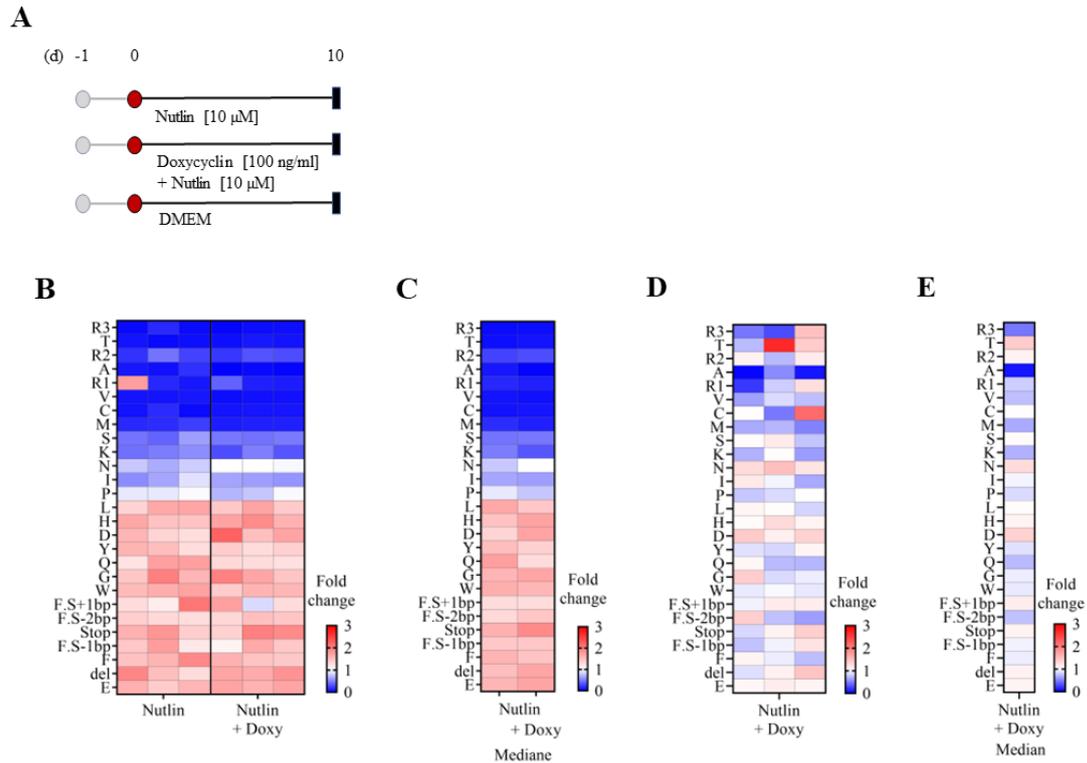


Abbildung 25: HCT116 *TP53^{A/LSL-R175-Library} TAp73 α* Behandlung mit der Kombination Nutlin und Doxycyclin

(A) Schematische Darstellung der verschiedenen Behandlungen. Kreis (grau): Aussaat der Zellen, Kreis (rot): Beginn der Behandlung bzw. des Glutaminentzugs, Balken (schwarz): Ernte der Zellen. (B) Heatmap der Fold change-Werte von drei unabhängigen Replikaten nach der Behandlung mit Nutlin und Doxycyclin in Kombination für zehn Tage, Normalisierung auf die unbehandelte Kontrolle, y-Achse: Mutationen in der Reihenfolge aus Abbildung 11D, x-Achse: jeweilige Behandlung, die Legende zeigt die Repräsentation der Fold change-Werte in Farbe. (C) Heatmap der Medianwerte der Fold change-Werte aus A. (D) Heatmap der Fold change-Werte der kombinierten Behandlung mit Nutlin und Doxycyclin normalisiert auf die alleinige Behandlung mit Nutlin. (E) Median der Fold change-Werte aus C.

3.3.5.3. HCT116 *TP53^{A/LSL-R175-Library} TAp73 α* unter lang andauernder MDM2-Inhibition

Damit p53-Mutationen einen GOF-Effekt aufweisen, ist eine Akkumulation notwendig (Yue et al., 2017). Um diese Akkumulation zu unterstützen, erfolgte eine Behandlung mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin für eine längere Zeitdauer als in den Experimenten zuvor von 30 bzw. 40 Tagen. Zusätzlich sollte dadurch WTp53-Aktivität vermindert werden. Anschließend folgten zehn Tage Expression von TAp73 durch die gleichzeitige Behandlung mit Doxycyclin (s. Abbildung 27A).

Die unterschiedlichen Zeitspannen der Nutlin-Behandlung, in Abbildung 26B nebeneinandergestellt, lassen erkennen, dass die längere MDM2-Inhibition zu einer stärkeren Depletion der stillen und WT-like-Mutationen sowie stärkeren Anreicherung

der pLOF- und LOF-Mutationen führte. Es ist gelungen durch eine 40-tägige Nutlin-Behandlung eine Zell-Library zu selektionieren, die nahezu ausschließlich aus LOF-Mutationen besteht.

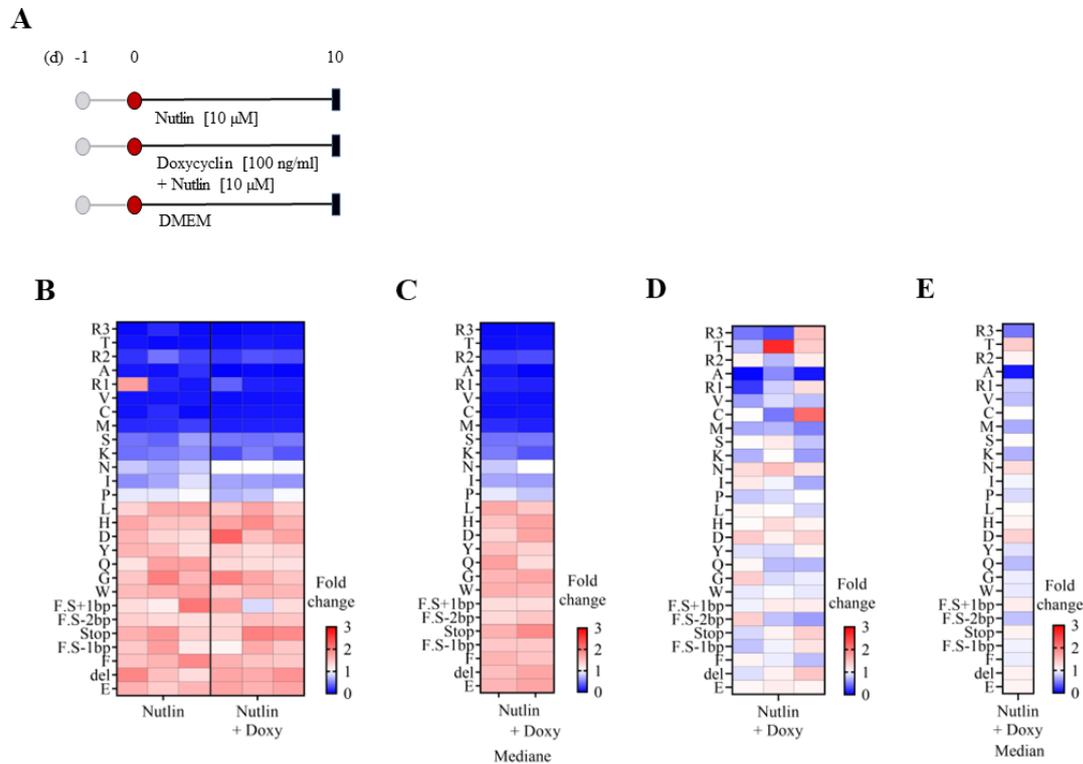


Abbildung 26 HCT116 *TP53^{A/R175}*-Library TAp73 α Behandlung mit Nutlin unterschiedliche Zeitspannen

(A) Schematische Darstellung der Behandlung mit Nutlin 10 μ M für unterschiedliche Zeitdauern, Kreis (grau): Aussaat der Zellen, Kreis (rot): Beginn der Behandlung, Balken (schwarz): Ernte der Zellen. (A) Heatmap der Fold change Werte von drei unabhängigen Replikaten nach der Behandlung mit Nutlin für zehn Tage und für 40 Tage, Normalisierung auf die unbehandelte Kontrolle, y-Achse: Mutationen in der Reihenfolge aus Abbildung 11D, x-Achse: jeweilige Behandlung, die Legende zeigt die Repräsentation der Fold change Werte in Farbe. (B) Heatmap der Medianwerte der Fold change-Werte aus A.

Nach der 30-tägigen Vorbehandlung mit Nutlin erfolgte eine zusätzliche Behandlung mit Doxycyclin zur Expression von TAp73 α . Die ausschließliche MDM2-Inhibition wie auch die kombinierte MDM2-Inhibition und TAp73 α -Expression zeigten keine großen Unterschiede in der Depletion oder Anreicherung einzelner Mutationen, wie aus Abbildung 27B und C hervorgeht. Es waren nahezu alle Mutationen außer der LOF-Mutationen depletiert. Zur isolierten Beurteilung der Expression von TAp73 α wurden die Werte der Kombinationsbehandlung von Nutlin und Doxycyclin erneut auf die alleinige Nutlin-Behandlung der Langzeitkultur normalisiert. Auch wenn sich in den Replikaten kleine Schwankungen ergaben (s. Abbildung 27D), zeigten die Medianwerte in Abbildung 27E mehrheitlich keine Änderung der Verteilung der Mutationen durch die

Expression von TAp73 α . Keine Mutation war unter Überexpression von TAp73 α und Akkumulation von MTP53 durch eine lang andauernde MDM2-Inhibition in besonderem Maße angereichert und wies somit keinen GOF-Effekt hinsichtlich der Inhibition von TAp73 α auf.

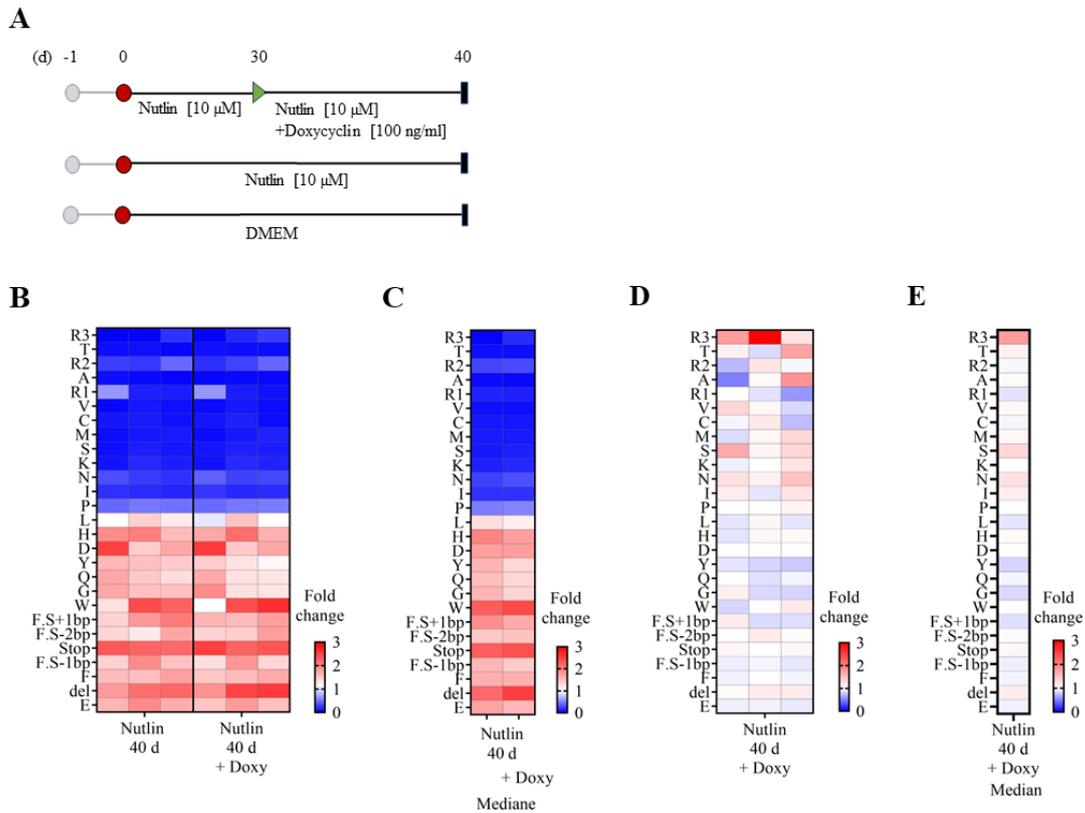


Abbildung 27: HCT116 *TP53^{A/-R175}*-Library TAp73 α Behandlung mit der Kombination Nutlin und Doxycyclin in der Langzeitkultur

(A) Schematische Darstellung der Behandlung, Kreis (grau): Aussaat der Zellen, Kreis (rot): Beginn der Behandlung, Pfeil (grün): Ergänzung um Behandlung mit Doxycyclin 100 ng/ml, Balken (schwarz): Ernte der Zellen. (B) Heatmap der Fold change Werte von drei unabhängigen Replikaten nach der Behandlung mit Nutlin für 30 Tage und anschließender Kombination mit Doxycyclin für zehn Tage, Normalisierung auf die unbehandelte Kontrolle, y-Achse: Mutationen in der Reihenfolge aus Abbildung 11D, x-Achse: jeweilige Behandlung, die Legende zeigt die Repräsentation der Fold change-Werte in Farbe. (C) Heatmap der Medianwerte der Fold change Werte aus B. (D) Heatmap der Fold change-Werte nach der kombinierten Behandlung mit Nutlin und Doxycyclin in der Langzeitkultur normalisiert auf die alleinige Behandlung mit Nutlin 40 Tage. (E) Heatmap des Medians der Fold change Werte aus D.

Insgesamt konnte in keinem Experiment für eine der 27 *TP53^{R175}*-Mutationen eine Anreicherung und somit ein Überlebensvorteil unter TAp73 α -Expression gezeigt werden wie folglich auch kein GOF-Effekt hinsichtlich der Inhibition von TAp73 α in diesem System nachgewiesen werden.

Ähnliche Versuche wurden auch mit den HCT116 *TP53^{Δ/-R175-Library}* TAp73β Zellen durchgeführt, jedoch führten diese aufgrund technischer Probleme nicht zu verwertbaren Ergebnissen.

4. DISKUSSION

Aufgrund der beträchtlichen Mutationshäufigkeit ist p53 ein interessantes Ziel zur Behandlung von Tumoren. Dennoch wurde bisher kein Medikament zur spezifischen Behandlung von MTP53-tragenden Tumoren zugelassen. Dass Mutationen an diversen Orten und verschiedenen dort eingebauten Aminosäuren unterschiedliche Auswirkungen auf die Proteinfunktion haben können (Kotler et al., 2018), erschwert es, eine für alle p53-Mutationen geeignete Therapie zu finden. Um Therapieansätze zu erforschen, ist daher eine Untersuchung vieler verschiedener Mutationen notwendig. Zur Untersuchung dieser, hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Proteinfunktion in verschiedenen Kontexten, ist es aus translationaler Sicht erforderlich, ein möglichst physiologisches System zu benutzen. Verwendet wurde hier die humane Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116. Diese war ursprünglich *TP53^{WT}* und vorab in der Arbeitsgruppe mittels CRISPR/Cas9 bereits derart verändert worden, dass ein *TP53*-Allel durch eine Deletion inaktiviert wurde. In das zweite Allel wurde eine reversible Stop-Kassette (LSL) integriert, die eine genetische Editierung ermöglicht. In das LSL-Allel wurde mittels CRISPR/Cas9 eine Mutationslibrary von 27 verschiedenen *TP53^{R175}*-Mutationen eingefügt und die LSL-Kassette mittels Cre-vermittelter Rekombination entfernt, sodass alle möglichen Mutationen des R175-Codons parallel untersucht werden konnten.

Mittels MDM2-Inhibition durch Nutlin wurde die Funktionalität des Systems bestätigt. Die MDM2-Inhibition imitierte Zellstress, der zur Stabilisierung von WTp53 führte und Zellzyklusarrest und Apoptose hervorrief. Die drei stillen Mutationen, die für das im WT-Protein vorliegende Arginin kodierte, waren unter Nutlin-Behandlung depletiert, was auf Stress-induzierte Apoptose und Zellzyklusarrest schließen ließ. Die Frameshift-Mutationen, die Stop-Mutation und die Deletion gehen mit einem p53-Funktionsverlust einher, der sich hier in einer Anreicherung und damit fehlender Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose zeigte. Dass die R175P-Mutation den pLOF-Mutationen zugeordnet wurde, stimmt damit überein, dass sie nicht in der Lage ist, Apoptose zu induzieren, jedoch aber Zellzyklusarrest (Liu et al., 2004; van Nguyen et al., 2007). Dadurch führte die Mutation in verschiedenen *in vivo*-Experimenten zu einer verlangsamten Tumorentstehung (Morton et al., 2010; Post et al., 2010). Dass einige Mutationen zu einer Depletion (wie die stillen Mutationen) und andere zu einer Anreicherung (wie die LOF-Mutationen) führten, ließ sie als WT-like oder ebenfalls LOF-Mutationen charakterisieren.

4.1. Fitness-Effekte von *TP53^{R175}*-Mutationen in Nährstoffmangelzuständen

4.1.1. HBSS als metabolischer Stressauslöser

Die wichtige Rolle von p53 im Metabolismus zeigt sich vor allem in Nährstoffmangelsituationen. P53 kann dafür sorgen, dass durch die Einleitung von Zellzyklusarrest Energie gespart und gleichzeitig katabole Stoffwechselwege wie die Fettsäureoxidation und Autophagie hochreguliert werden. Bei anhaltendem Stress kann p53 auch zur Eliminierung der Zellen beitragen (Humpton et al., 2018).

Der Nährstoffmangel mit HBSS wurde für drei Tage aufrechterhalten, anschließend war nach einem Mediumwechsel eine normale Nährstoffumgebung für sieben Tage gegeben. HBSS führte zur Depletion der stillen wie auch der WT-like Mutationen, was auf die Stabilisierung von p53 als Antwort auf Nährstoffmangel und die damit verbundene Induktion von Zellzyklusarrest oder Apoptose zurückzuführen ist (Humpton et al., 2018). pLOF- und LOF-Mutationen waren hingegen angereichert und förderten folglich die Bewältigung einer Nährstoffmangelsituation.

4.1.2. *TP53^{R175}*-Mutationen unter Glukoseentzug

Die unterschiedlichen Auswirkungen von WTP53 und MTP53 auf den Glukosestoffwechsel (Liu et al., 2015) verändern auch die metabolische Angreifbarkeit. Unter glukosearmen Bedingungen führt WTP53 AMPK-vermittelt zu einem transienten Zellzyklusarrest, der die Zelle vor unkontrollierter Proliferation trotz Nährstoffmangel schützt (Jones et al., 2005).

Hier waren unter absolutem Glukose- und Pyruvatmangel sowohl die stillen und WT-like Mutationen depletiert und LOF-Mutationen angereichert. Die Kombination des Glukoseentzugs mit der MDM2-Inhibition durch die Behandlung mit Nutlin verstärkte diesen Effekt.

Jones et al. (2005) verwendeten hauptsächlich Medien mit geringem Glukoseanteil, da sie feststellten, dass p53 darunter zu einem transienten Zellzyklusarrest und unter absolutem Glukosemangel zu apoptotischen Zelluntergang führte. Die Depletion der stillen und WT-like Mutationen nach einem Tag Glukoseentzug lässt sich somit am ehesten auf p53-vermittelte Apoptose zurückführen, zu der LOF-Mutationen wie die Frameshift- und Nonsense-Mutationen nicht in der Lage sind. Diese Feststellung trafen

auch Okoshi et al. (2008) bei dem Vergleich von WTP53-tragenden U2OS-Osteosarkomzellen mit p53-negativen SAOS-2-Osteosarkomzellen.

Für die *TP53^{R175H}*-Mutation konnte ein GOF im Metabolismus durch eine gesteigerte Glukoseaufnahme und Glykolyserate bestätigt werden (Eriksson et al., 2017). Dennoch wurde in Melanomzellen gezeigt, dass p53R175H-Zellen durch die Nutzung von Pyruvat unter Glukosemangel überleben können (Chavez-Perez et al., 2011). Da hier pyruvatfreies Medium verwendet wurde, konnte das für die R175H-Mutante in diesem Kontext nicht bestätigt werden.

4.1.3. *TP53^{R175}*-Mutationen unter Glutaminentzug

P53 beeinflusst den Glutaminstoffwechsel durch Erhöhung der Expression der Glutaminase 2, um die Glutathionkonzentration zur Bekämpfung von ROS zu erhöhen (Chen and Cui, 2015). Aufgrund der anfangs schlechten Vaskularisation bei der Tumorentstehung ist es für Tumorzellen wichtig, Mechanismen zu entwickeln, um Glutaminmangel zu überleben (Tajan et al., 2018). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass WTP53 durch verschiedene Mechanismen zum Überleben unter Glutaminmangel beiträgt (Tajan et al., 2018; Lowman et al., 2019). Im Fall von p53-Mutationen ist das Überleben unter Glutaminmangel von der Mutation abhängig: R248W konnte das Zellwachstum unter Glutaminmangel sichern, während R175H dazu nicht in der Lage war (Tajan et al., 2018). Das Überleben von R248Q und R273H ging sogar über das von WTP53 hinaus, was als GOF angesehen werden kann. (Tran et al., 2017).

Überraschenderweise zeigte sich in den Glutaminmangelversuchen der *TP53^{R175}*-Library eine Depletion der stillen Mutationen sowie der WT-like-Mutationen, die sich mit längerer Dauer des Glutaminmangels verstärkte. Wie auch in den anderen Nährstoffmangelversuchen waren die LOF-Mutationen und pLOF-Mutationen angereichert.

4.1.4. Zusammenfassung der Fitness-Effekte von *TP53^{R175}*-Mutationen und Ausblick

In allen Nährstoffmangelsituationen führten die stillen Mutationen zu einer Depletion der Zellen und die LOF-Mutationen zu einer Anreicherung, wie bereits unter Behandlung mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin. Die Fold change-Werte waren jedoch deutlich niedriger als unter der Behandlung mit Nutlin. Eine Erklärung ist, dass Nutlin spezifisch zur Stabilisierung von p53 führt, während HBSS, Glukose- und Glutaminentzug ebenfalls

andere Stressmechanismen aktivieren. P53-Mutationen haben somit wahrscheinlich unter Nutlin größere Auswirkungen. Dass eine $TP53^{R175}$ -Mutation einen GOF im Metabolismus bedingt, der das Überleben der Tumorzelle in besonderem Maße fördert, war in keinem Nährstoffmangelversuch sichtbar.

Für das Codon R175 von $TP53$ wurde bestätigt, dass die sich durch die Mutation ergebende Aminosäure einen Einfluss auf die Proteinfunktion hat (Kotler et al., 2018). Auch wenn in keiner der getesteten Nährstoffmangelsituationen ein GOF für eine $TP53^{R175}$ -Mutation nachgewiesen werden konnte, lässt sich schlussfolgern, dass die Wirkungen verschiedener Mutationen zu unterschiedlich sind, um allgemein von GOF im Metabolismus zu sprechen. Während für die R175H-Mutation einerseits eine gesteigerte Glukoseaufnahme und Glykolyse nachgewiesen ist (Eriksson et al., 2017), sowie die mögliche Nutzung von exogenem Pyruvat unter Glukosemangel (Chavez-Perez et al., 2011), konnte andererseits unter Glutaminmangel das Zellwachstum nicht gesichert werden (Tajan et al., 2018).

Grundsätzlich gibt es Möglichkeiten Glukose- oder Glutaminentzug pharmakologisch zu induzieren. Für den Glukosestoffwechsel wurden Substanzen wie 2-DG, welche den ersten Schritt der Glykolyse hemmt, entdeckt (Pajak et al., 2019). Der Glutaminstoffwechsel kann beispielsweise durch GLS2-Inhibitoren gestört werden (Li et al., 2021). Die hier gezeigten Daten deuten darauf hin, dass p53-LOF-Mutationen zu einer relativen Resistenz gegenüber diesen Substanzen führen könnten.

4.2. Untersuchung des GOF-Effekts von $TP53^{R175}$ -Mutationen in Bezug auf p73

Mechanistisch äußert sich GOF von p53-Mutationen u.a. in der Inhibition von p73 (Oren and Rotter, 2010). P73 ist in vielen Tumoren überexprimiert und wird durch mutiertes p53 unter Kontrolle gehalten (Gaiddon et al., 2001). In *in vivo*-Modellen metastasierte die R172H-Mutante (im Menschen R175H entsprechend) schneller und interagierte ebenfalls mit p73 (Lang et al., 2004; Olive et al., 2004).

Zur Untersuchung des GOF-Effekts hinsichtlich der Inhibition von p73 wurden Doxycyclin-induzierbar TAp73 α und TAp73 β lentiviral in HCT116 $TP53^{4/LSL}$ -Zellen transduziert. Von diesen Zellpopulationen wurden erfolgreich Einzelzellklone generiert und funktionell charakterisiert.

Der Nachweis der Expression von p73 nach einer Behandlung mit Doxycyclin erfolgte mittels Western Blot. Da TAp73 β ein kürzeres und damit leichteres Protein als TAp73 α ist, läuft TAp73 α in der Gelelektrophorese weiter. Das abnehmende Signal für p73 mit länger andauernder Behandlung mit Doxycyclin und damit einhergehend zu erwartender höherer p73-Expression ist auf die Wirkung von p73 zurückzuführen. Durch den p73-vermittelten Zellzyklusarrest und die Apoptose wird die Zahl p73-exprimierender Zellen in der Zellpopulation vermindert und damit auch das nachweisbare p73. Bei der Detektion der p73-Expression im Western Blot waren für Klon #2 der HCT116 *TP53^{A/LSL}* TAp73 β Zelllinie drei Banden zu erkennen, die am ehesten auf unspezifische Antikörperbindungen zurückzuführen sind. Dass p73 β stärker Apoptose aktiviert (Vikhreva et al., 2018), spiegelt sich in den PI-FACS-Analysen wider.

Jeweils Klon #3 der HCT116 *TP53^{A/LSL}* TAp73 α und TAp73 β wurde nach Berücksichtigung aller Ergebnisse ausgesucht, um die *TP53^{R175}*-Library zu transfizieren und einen möglichen GOF-Effekt zu untersuchen. Die Klone zeigten eine Doxycyclin-induzierbare, im Western Blot nachweisbare Expression von p73. Funktionell wurde ebenfalls Doxycyclin-induzierbar p73-vermittelt Apoptose sowie Zellzyklusarrest nachgewiesen. Dies zeigte sich außerdem im Koloniebildungstest durch eine reduzierte Proliferationskapazität nach der Behandlung mit Doxycyclin.

4.2.1. *TP53^{R175}*-Mutationen unter Expression von TAp73 α

Dass die Transfektion der *TP53^{R175}*-Library erfolgreich funktioniert hat, wurde durch die Ergebnisse der Nutlin-Behandlung bestätigt. Wie bereits zuvor waren die stillen und WT-like-Mutationen am stärksten depletiert, LOF-Mutationen angereichert. pLOF-Mutationen waren weniger stark vermindert. Die 40 Tage andauernde Nutlin-Behandlung führte zu einer effizienten Depletion aller WT-like- und pLOF-Mutationen und damit zu einer Selektion von LOF-Mutationen. Durch die Behandlung mit Doxycyclin erfolgte die Expression von TAp73 α . Hierunter waren zwei der stillen Mutationen leicht angereichert, was nicht damit übereinstimmt, dass WTp53 nicht mit p73 interagiert (Di Como et al., 1999; Stindt et al., 2015). Auch die Kombination mit kurzzeitiger oder langzeitiger MDM2-Inhibition zur Stabilisierung und Depletion der stillen Mutationen führte nicht zur Anreicherung einer Mutation. Somit konnte für keine der *TP53^{R175}*-Mutationen ein GOF hinsichtlich der Inhibition von TAp73 α nachgewiesen werden.

4.3. Mögliche Beeinflussung der Ergebnisse

4.3.1. Die Rolle von Geneticin

Während der Untersuchung des GOF-Effekts von $TP53^{R175}$ -Mutationen in Bezug auf p73 wurden die Zellen dauerhaft mit der Hinzugabe von Geneticin kultiviert. Für Aminoglykoside wie Geneticin wurde festgestellt, dass sie an ribosomale RNA binden und zu einem „readthrough“, also zur Entstehung eines normallangen Proteins trotz vorzeitigem Stop-Codon, führen können. In HDQ-P1 $TP53^{R213X}$ -Mammakarzinomzellen konnte dies für die Expression von p53 und Induktion dessen Zielgene nachgewiesen werden (Floquet et al., 2011). Durch die Kombination von Geneticin mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin konnte in H1299-Zellen mit transfizierter $TP53^{R213X}$ -Mutation eine gesteigerte Expression von p53 sowie die Induktion von Apoptose und ein vermindertes Zellwachstum festgestellt werden (Zhang et al., 2017). Die HCT116 $TP53^{\Delta/R175}$ -Library TAp73 α Zellen wurden dauerhaft mit Geneticin und teilweise zusätzlich mit Nutlin behandelt. Dabei hätte die Stop-Mutation depletiert sein müssen, wie die stillen Mutationen, wenn Geneticin zu einem *readthrough* geführt hätte. Bereits zuvor wurde allerdings gezeigt, dass dieser *readthrough* durch Antibiotikatherapie nur für einige wenige p53-nonsense-Mutationen funktioniert und stark von der Nukleotidsequenz abhängt (Floquet et al., 2011).

4.3.2. Einfluss des Codon 72-Polymorphismus

In Sequenzierungen nach den Transfektionen wurde nachgewiesen, dass in den parental HCT116 Zellen das Codon 72 des p53-Proteins für Arginin kodiert, während es in den HCT116 $TP53^{\Delta/R175}$ -Library-Zellen Prolin ist (Daten nicht gezeigt). Dieser Polymorphismus beeinflusst die p53-induzierte Stressantwort unter Nährstoffmangel. 72R Zellen weisen eine erhöhte Transaktivierung von p21 mit vermehrtem Wachstumsstillstand und verminderter Apoptose auf, was ein verbessertes Überleben zur Folge hat (Kung et al., 2017). In den HCT116 $TP53^{\Delta/R175}$ -Library-Zellen bedingt 72P möglicherweise ein schlechteres Überleben der stillen und WT-like Mutationen.

Durch den Polymorphismus am Codon 72 kann außerdem die Bindungsaffinität von MTP53 zu p73 beeinflusst werden. Wenn Mutationen in der 72R statt der 72P Variante auftreten, wird p73 stärker unterdrückt (Ferraiuolo et al., 2016; Vikhreva et al., 2018). Für die HCT116 $TP53^{\Delta/R175}$ -Library-Zellen bedeutet das, dass die Bindung von p73 schwächer sein kann.

4.3.3. Akkumulation und Selektionsdruck nicht ausreichend für den Nachweis eines GOF

Zur Ausübung von GOF-Effekten von mutiertem p53 ist dessen Akkumulation notwendig (Yue et al., 2017). In unserem System wurden p53-Mutationen artifiziell eingefügt, auf die die Zellen zur Tumorentstehung nicht angewiesen waren. Möglicherweise war die Expression der Mutationen nicht ausreichend, um einen GOF hervorzubringen. Kotler et al. (2018) machten die gleiche Feststellung in ihrer lentiviral eingefügten p53-Mutationslibrary. Durch die Injektion der Tumorzellen in Mäuse und anschließender Extraktion der Tumore wurde ein Selektionsdruck auf die Mutationen ausgeübt, der einen Überlebensvorteil der Hotspot Mutationen in Erscheinung treten ließ. In unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Western Blots (Daten nicht gezeigt) zeigten, dass die HCT116-Zellen keine Akkumulation von MTP53 aufwiesen. Deswegen ist auch davon auszugehen, dass ebenfalls die für die Ausübung von GOF-Effekten besonders im Hinblick auf die Inhibition von p73 notwendige Aggregation von p53-Proteinen (Xu et al., 2011) in diesem Zellsystem nicht gegeben war. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Akkumulation und Aggregation keine direkte Konsequenz der Mutation sind. Auch eine zusätzliche Stabilisierung der Mutation durch die Behandlung mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin, welche im Western Blot nachweisbar zu einer verstärkten Expression der MTP53-Proteine geführt hat (Funk et al., 2023) war nicht ausreichend, um GOF-Effekte sichtbar zu machen. In Zukunft sollte die *TP53^{R175}*-Mutationslibrary in einer p53-mutierten Zelllinie, in der MTP53-Akkumulation und GOF-Effekte nachweisbar sind, durchgeführt werden.

Aus translationaler Sicht lässt sich schlussfolgern, dass der genetische Nachweis der Mutation alleine für die Abschätzung möglicher GOF-Effekte nicht ausreicht. Ein immunhistochemischer Nachweis der Protein-Akkumulation und -Aggregation ist ebenfalls nötig.

4.4. Fazit und Ausblick

Die HCT116 *TP53^{R175}*-Library wurde erfolgreich erstellt und die Funktionalität mithilfe verschiedener Stressstimuli nachgewiesen. Stille Mutationen, die zur Expression eines WTP53-Proteins führen, waren unter Behandlung mit Nutlin sowie unter Nährstoffmangelzuständen vermindert, LOF-Mutationen hingegen führten zu einer Anreicherung. In diesem Zellsystem ist für keine der R175-Mutationen ein GOF-Effekt unter Nährstoffmangelzuständen oder in Bezug auf die Inhibition von TAp73 α sichtbar.

Um einen GOF nachzuweisen, sollte die *TP53^{R175}*-Mutationslibrary in einer p53-mutierten Zelllinie untersucht werden.

Das System wurde innerhalb der Arbeitsgruppe bereits auf eine Library aller möglichen Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne (Exons 5-8) ausgeweitet, um noch mehr Mutationen parallel zu analysieren. Um zellspezifische Effekte auszuschließen, wurde ein ähnliches Experiment mit einer Mutationslibrary in H460-Zellen durchgeführt (Funk et al., 2023).

5. ZUSAMMENFASSUNGEN

5.1. Zusammenfassung

TP53 ist das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Tumoren. Mutationen des Tumorsuppressors p53 finden sich in fast allen Tumorentitäten, durchschnittlich in 50 % aller Patienten. Der Großteil der Mutationen sind einzelne Missense Mutationen, welche in der DNA-Bindungsdomäne liegen und zur Ausbildung eines mutierten Proteins ganzer Länge führen. Neben einem Funktionsverlust (LOF) oder der Behinderung des verbleibenden Wildtyp-Allels, bekannt als dominant-negativer Effekt (DN), kann eine Mutation auch zu einem *gain of function* (GOF) führen, sodass die Tumorzellen schneller proliferieren, metastasieren oder resistent gegenüber Zytostatika werden. Mechanistisch äußert sich GOF z.B. in metabolischen Veränderungen, auch unter Nährstoffmangel, oder der Inhibition anderer Tumorsuppressoren wie p73. Bisher wurde dies nur für einzelne wenige p53-Mutationen gezeigt, jedoch liegen in Patienten viele verschiedene vor, die sich in ihren Auswirkungen unterscheiden. Ziel dieser Arbeit war es, diverse Mutationen hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die proliferative Fitness von Tumorzellen unter Nährstoffmangelzuständen wie Glukose- oder Glutaminentzug sowie einer möglichen Inhibition von p73 zu untersuchen. Verwendet wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie HCT116, welche mittels *CRISPR/Cas9* derart modifiziert wurde, dass eine Library aller möglichen Mutationen am Hotspot Codon 175 durch Rekombination eingesetzt werden konnte. Nach einer medikamentösen Behandlung oder einem Nährstoffentzug erfolgte die Extraktion von genomischer DNA, welche mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert wurde, sodass eine Anreicherung oder Depletion von Zellen mit bestimmten Mutationen aufgezeigt werden konnte. Diese Depletion oder Anreicherung führte zur Charakterisierung von p53-Mutationen als WT-like, LOF oder pLOF, jedoch wurde für keine der *TP53^{R175}*-Mutationen ein GOF nachgewiesen. Zur Analyse des GOF-Effekts in Bezug auf die Inhibition von p73 wurden die Isoformen TAp73 α oder TAp73 β Doxycyclin-induzierbar überexprimiert. Hier konnte für keine der *TP53^{R175}*-Mutationen ein GOF hinsichtlich einer Inhibition von p73 nachgewiesen werden. Diese Arbeit bestätigt die unterschiedlichen Auswirkungen verschiedener Aminosäureänderungen im p53-Protein bezüglich der Überlebensfähigkeit in Nährstoffmangelzuständen.

5.2. Summary

TP53 is the most commonly mutated gene in human tumors. Mutations of the tumor suppressor p53 are found in almost all tumor entities, on average in 50 % of all patients. The majority of mutations are single missense mutations which are located in the DNA binding domain and lead to the expression of a mutated full length protein. Besides a loss of function (LOF) or inhibition of the remaining wildtype-allele, known as dominant-negative effect (DN), a mutation can lead to a gain of function (GOF), so that tumor cells can proliferate more rapidly, metastasize or become resistant to cytostatic drugs. Mechanistically, GOF manifests itself in metabolic changes, also under nutrient deficiency, or inhibition of other tumor suppressors such as p73. So far, this has only been shown for a few p53 mutations but many different ones are present in patients which differ in their consequences. The aim of this project was to investigate different mutations regarding their fitness effects under nutrient deprivation conditions such as glucose or glutamine starvation as well as a possible inhibition of p73. The human colon carcinoma cell line HCT116 was used, which was modified using CRISPR/Cas9, so that a library of all possible mutations for hotspot codon 175 could be introduced by recombination. Drug treatment or nutrient deprivation was followed by extraction of genomic DNA, which was amplified by PCR and subsequently sequenced, revealing enrichment or depletion of cells with specific mutations. This depletion or enrichment led to the characterization of p53 mutations as WT-like, LOF, or pLOF, but no GOF was detected for any of the *TP53^{R175}* mutations. To analyze the GOF effect in regard to the inhibition of p73, the isoforms TAp73 α or TAp73 β were overexpressed in a doxycyclin-inducible manner. Here, for none of the *TP53^{R175}* R175 mutations a GOF with respect to inhibition of p73 was observed. This work confirms the different impacts of various amino acid changes in the p53 protein concerning viability in nutrient deficient conditions.

LITERATURVERZEICHNIS

Alexandrova, E.M., Mirza, S.A., Xu, S., Schulz-Heddergott, R., Marchenko, N.D., and Moll, U.M. (2017). p53 loss-of-heterozygosity is a necessary prerequisite for mutant p53 stabilization and gain-of-function in vivo. *Cell death & disease* 8, e2661. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.80>.

Alexandrova, E.M., Yallowitz, A.R., Li, D., Xu, S., Schulz, R., Proia, D.A., Lozano, G., Dobbstein, M., and Moll, U.M. (2015). Improving survival by exploiting tumour dependence on stabilized mutant p53 for treatment. *Nature* 523, 352-356. <https://doi.org/10.1038/nature14430>.

Altman, B.J., Stine, Z.E., and Dang, C.V. (2016). From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 16, 619-634. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.71>.

Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., and Preisinger, A.C. (1989). Chromosome 17 Deletions and p53 Gene Mutations in Colorectal Carcinomas. *Science (New York, N.Y.)* 244, 217-221. <https://doi.org/10.1126/science.2649981>.

Baugh, E.H., Ke, H., Levine, A.J., Bonneau, R.A., and Chan, C.S. (2018). Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? *Cell Death Differ* 25, 154-160. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.180>.

BD Accur1™ C6 Flow Cytometer Optical Filter Guide.

Biegging, K.T., Mello, S.S., and Attardi, L.D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nature Reviews Cancer* 14, 359-370. <https://doi.org/10.1038/nrc3711>.

Bossi, G., Marampon, F., Maor-Aloni, R., Zani, B., Rotter, V., Oren, M., Strano, S., Blandino, G., and Sacchi, A. (2008). Conditional RNA interference in vivo to study mutant p53 oncogenic gain of function on tumor malignancy. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 7, 1870-1879. <https://doi.org/10.4161/cc.7.12.6161>.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

Brosh, R., and Rotter, V. (2009). When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nature Reviews Cancer* 9, 701-713. <https://doi.org/10.1038/nrc2693>.

- Bykov, V.J.N., Eriksson, S.E., Bianchi, J., and Wiman, K.G. (2018). Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* *18*, 89-102. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.109>.
- Cai, B.-H., Hsu, Y.-C., Yeh, F.-Y., Lin, Y.-R., Lu, R.-Y., Yu, S.-J., Shaw, J.-F., Wu, M.-H., Tsai, Y.-Z., and Lin, Y.-C., et al. (2022). P63 and P73 Activation in Cancers with p53 Mutation. *Biomedicines* *10*. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071490>.
- Cairns, R.A., Harris, I., McCracken, S., and Mak, T.W. (2011). Cancer cell metabolism. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* *76*, 299-311. <https://doi.org/10.1101/sqb.2011.76.012856>.
- (2022). Cellular Analysis using the Coulter Principle: Measurement with Great Accuracy and Speed. <https://www.beckman.de/resources/reading-material/application-notes/cellular-analysis-using-the-coulter-principle>. 11.09.2022.
- Chavez-Perez, V.A., Strasberg-Rieber, M., and Rieber, M. (2011). Metabolic utilization of exogenous pyruvate by mutant p53 (R175H) human melanoma cells promotes survival under glucose depletion. *Cancer biology & therapy* *12*, 647-656. <https://doi.org/10.4161/cbt.12.7.16566>.
- Chen, L., and Cui, H. (2015). Targeting Glutamine Induces Apoptosis: A Cancer Therapy Approach. *International journal of molecular sciences* *16*, 22830-22855. <https://doi.org/10.3390/ijms160922830>.
- Chiang, Y.-T., Chien, Y.-C., Lin, Y.-H., Wu, H.-H., Lee, D.-F., and Yu, Y.-L. (2021). The Function of the Mutant p53-R175H in Cancer. *Cancers (Basel)* *13*. <https://doi.org/10.3390/cancers13164088>.
- Contractor, T., and Harris, C.R. (2012). p53 negatively regulates transcription of the pyruvate dehydrogenase kinase Pdk2. *Cancer Research* *72*, 560-567. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1215>.
- DeBerardinis, R.J., and Cheng, T. (2010). Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* *29*, 313-324. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.358>.
- Deininger, M.W., Goldman, J.M., Lydon, N., and Melo, J.V. (1997). The Tyrosine Kinase Inhibitor CGP57148B Selectively Inhibits the Growth of BCR-ABL-Positive Cells. *Blood* *90*, 3691-3698. <https://doi.org/10.1182/blood.V90.9.3691>.

- Di Como, C.J., Gaiddon, C., and Prives, C. (1999). p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 19, 1438-1449. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.2.1438>.
- Diamandis, M., White, N.M.A., and Yousef, G.M. (2010). Personalized medicine: marking a new epoch in cancer patient management. *Molecular cancer research : MCR* 8, 1175-1187. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0264>.
- Dittmer, D., Pati, S., Zambetti, G., Chu, S., Teresky, A.K., Moore, M., Finlay, C., and Levine, A.J. (1993). Gain of function mutations in p53. *Nature genetics* 4, 42-46. <https://doi.org/10.1038/ng0593-42>.
- Druker, B.J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G.M., Fanning, S., Zimmermann, J., and Lydon (1996). Effects of a tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature medicine* 2, 561-566. <https://doi.org/10.1038/nm0596-561>.
- Eriksson, M., Ambroise, G., Ouchida, A.T., Lima Queiroz, A., Smith, D., Gimenez-Cassina, A., Iwanicki, M.P., Muller, P.A., Norberg, E., and Vakifahmetoglu-Norberg, H. (2017). Effect of Mutant p53 Proteins on Glycolysis and Mitochondrial Metabolism. *Mol Cell Biol* 37, e00328-17. <https://doi.org/10.1128/MCB.00328-17>.
- Ferraiuolo, M., Di Agostino, S., Blandino, G., and Strano, S. (2016). Oncogenic Intra-p53 Family Member Interactions in Human Cancers. *Frontiers in oncology* 6, 77. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00077>.
- Floquet, C., Deforges, J., Rousset, J.-P., and Bidou, L. (2011). Rescue of non-sense mutated p53 tumor suppressor gene by aminoglycosides. *Nucleic acids research* 39, 3350-3362. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1277>.
- Freed-Pastor, W.A., and Prives, C. (2012). Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev* 26, 1268-1286. <https://doi.org/10.1101/gad.190678.112>.
- Funk, J., Klimovich, M., Pavlakis, E., Neumann, M., Drangenstein, D., Noeparast, M., Hunold, P., Borowek, A., Balourdas, D.-I., and Kochhan, K., et al. (2023). Functional diversity of the TP53 mutome revealed by saturating CRISPR mutagenesis.
- Gaiddon, C., Lokshin, M., Ahn, J., Zhang, T., and Prives, C. (2001). A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol* 21, 1874-1887. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.5.1874-1887.2001>.

- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hehlmann, R. (2020). Chronic Myeloid Leukemia in 2020. *HemaSphere* *4*, e468. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000468>.
- Hernández Borrero, L.J., and El-Deiry, W.S. (2021). Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer* *1876*, 188556. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188556>.
- Horvat, A., Tadijan, A., Vlašić, I., and Slade, N. (2021). p53/p73 Protein Network in Colorectal Cancer and Other Human Malignancies. *Cancers (Basel)* *13*. <https://doi.org/10.3390/cancers13122885>.
- Hu, J., Cao, J., Topatana, W., Juengpanich, S., Li, S., Zhang, B., Shen, J., Cai, L., Cai, X., and Chen, M. (2021). Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies. *Journal of hematology & oncology* *14*, 157. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01169-0>.
- Hu, W., Zhang, C., Wu, R., Sun, Y., Levine, A., and Feng, Z. (2010). Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 7455-7460. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001006107>.
- Humpton, T.J., Hock, A.K., Maddocks, O.D.K., and Vousden, K.H. (2018). p53-mediated adaptation to serine starvation is retained by a common tumour-derived mutant. *Cancer Metab* *6*, 18. <https://doi.org/10.1186/s40170-018-0191-6>.
- Ishak Gabra, M.B., Yang, Y., Lowman, X.H., Reid, M.A., Tran, T.Q., and Kong, M. (2018). IKK β activates p53 to promote cancer cell adaptation to glutamine deprivation. *Oncogenesis* *7*, 93. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0104-0>.
- Jiang, P., Du, W., Wang, X., Mancuso, A., Gao, X., Wu, M., and Yang, X. (2011). p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nature Cell Biology* *13*, 310-316. <https://doi.org/10.1038/ncb2172>.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)* *337*, 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.

- Joerger, A.C., and Fersht, A.R. (2010). The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a000919. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000919>.
- Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J., and Thompson, C.B. (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Molecular cell* 18, 283-293. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.027>.
- Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., and Wyczalkowski, M.A., et al. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502, 333-339. <https://doi.org/10.1038/nature12634>.
- Kato, S., Han, S.-Y., Liu, W., Otsuka, K., Shibata, H., Kanamaru, R., and Ishioka, C. (2003). Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8424-8429. <https://doi.org/10.1073/pnas.1431692100>.
- Kawauchi, K., Araki, K., Tobiume, K., and Tanaka, N. (2008). p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nature Cell Biology* 10, 611-618. <https://doi.org/10.1038/ncb1724>.
- Kim, J., Yu, L., Chen, W., Xu, Y., Wu, M., Todorova, D., Tang, Q., Feng, B., Jiang, L., and He, J., et al. (2019). Wild-Type p53 Promotes Cancer Metabolic Switch by Inducing PUMA-Dependent Suppression of Oxidative Phosphorylation. *Cancer cell* 35, 191-203.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.12.012>.
- Kim, M.P., and Lozano, G. (2018). Mutant p53 partners in crime. *Cell Death Differ* 25, 161-168. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.185>.
- Konopleva, M., Martinelli, G., Daver, N., Papayannidis, C., Wei, A., Higgins, B., Ott, M., Mascarenhas, J., and Andreeff, M. (2020). MDM2 inhibition: an important step forward in cancer therapy. *Leukemia* 34, 2858-2874. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0949-z>.
- Kotler, E., Shani, O., Goldfeld, G., Lotan-Pompan, M., Tarcic, O., Gershoni, A., Hopf, T.A., Marks, D.S., Oren, M., and Segal, E. (2018). A Systematic p53 Mutation Library Links Differential Functional Impact to Cancer Mutation Pattern and Evolutionary

Conservation. *Molecular cell* 71, 178-190.e8.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.012>.

Kovvali, G.K., Mehta, B., Epstein, C.B., and Lutzker, S.G. (2001). Identification of partial loss of function p53 gene mutations utilizing a yeast-based functional assay.

Nucleic acids research 29, E28. <https://doi.org/10.1093/nar/29.5.e28>.

Kravchenko, J.E., Ilyinskaya, G.V., Komarov, P.G., Agapova, L.S., Kochetkov, D.V., Strom, E., Frolova, E.I., Kovriga, I., Gudkov, A.V., and Feinstein, E., et al. (2008).

Small-molecule RETRA suppresses mutant p53-bearing cancer cells through a p73-dependent salvage pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6302-6307.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0802091105>.

Kruiswijk, F., Labuschagne, C.F., and Vousden, K.H. (2015). p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16, 393-405.

<https://doi.org/10.1038/nrm4007>.

Kumar, P., Nagarajan, A., and Uchil, P. (2019). Electroporation. *Cold Spring Harbor protocols* 2019. <https://doi.org/10.1101/pdb.top096271>.

Kung, C.-P., Liu, Q., and Murphy, M.E. (2017). The codon 72 polymorphism of p53 influences cell fate following nutrient deprivation. *Cancer biology & therapy* 18, 484-491. <https://doi.org/10.1080/15384047.2017.1323595>.

Lacroix, M., Riscal, R., Arena, G., Linares, L.K., and Le Cam, L. (2020). Metabolic functions of the tumor suppressor p53: Implications in normal physiology, metabolic disorders, and cancer. *Molecular metabolism* 33, 2-22.

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.10.002>.

Lane, D.P. (1992). p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.

<https://doi.org/10.1038/358015a0>.

Lang, G.A., Iwakuma, T., Suh, Y.-A., Liu, G., Rao, V.A., Parant, J.M., Valentin-Vega, Y.A., Terzian, T., Caldwell, L.C., and Strong, L.C., et al. (2004). Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 119, 861-872.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.006>.

Levine, A.J., and Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature Reviews Cancer* 9, 749-758. <https://doi.org/10.1038/nrc2723>.

- Li, T., Copeland, C., and Le, A. (2021). Glutamine Metabolism in Cancer. *Advances in experimental medicine and biology* 1311, 17-38. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65768-0_2.
- Li, Y., and Prives, C. (2007). Are interactions with p63 and p73 involved in mutant p53 gain of oncogenic function? *Oncogene* 26, 2220-2225. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210311>.
- Liu, G., Parant, J.M., Lang, G., Chau, P., Chavez-Reyes, A., El-Naggar, A.K., Multani, A., Chang, S., and Lozano, G. (2004). Chromosome stability, in the absence of apoptosis, is critical for suppression of tumorigenesis in Trp53 mutant mice. *Nature genetics* 36, 63-68. <https://doi.org/10.1038/ng1282>.
- Liu, J., Zhang, C., Hu, W., and Feng, Z. (2015). Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism. *Cancer letters* 356, 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.12.025>.
- Liu, J., Zhang, C., Hu, W., and Feng, Z. (2019). Tumor suppressor p53 and metabolism. *J Mol Cell Biol* 11, 284-292. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy070>.
- Lowman, X.H., Hanse, E.A., Yang, Y., Ishak Gabra, M.B., Tran, T.Q., Li, H., and Kong, M. (2019). p53 Promotes Cancer Cell Adaptation to Glutamine Deprivation by Upregulating Slc7a3 to Increase Arginine Uptake. *Cell reports* 26, 3051-3060.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.037>.
- Maddocks, O.D.K., and Vousden, K.H. (2011). Metabolic regulation by p53. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 89, 237-245. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0735-5>.
- McKinnon, K.M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology* 120, 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>.
- Morton, J.P., Timpson, P., Karim, S.A., Ridgway, R.A., Athineos, D., Doyle, B., Jamieson, N.B., Oien, K.A., Lowy, A.M., and Brunton, V.G., et al. (2010). Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 246-251. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908428107>.
- Muller, P.A.J., and Vousden, K.H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nature Cell Biology* 15, 2-8. <https://doi.org/10.1038/ncb2641>.

- Nahta, R., and Esteva, F.J. (2007). Trastuzumab: triumphs and tribulations. *Oncogene* 26, 3637-3643. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210379>.
- NanoDrop Technologies. nd-1000-v3.8-users-manual-8 5x11.
- National Cancer Institute (2022). Definition of personalized medicine - NCI Dictionary of Cancer Terms. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/personalized-medicine>. 09.09.2022.
- Okoshi, R., Ozaki, T., Yamamoto, H., Ando, K., Koida, N., Ono, S., Koda, T., Kamijo, T., Nakagawara, A., and Kizaki, H. (2008). Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress. *The Journal of biological chemistry* 283, 3979-3987. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705232200>.
- Olive, K.P., Tuveson, D.A., Ruhe, Z.C., Yin, B., Willis, N.A., Bronson, R.T., Crowley, D., and Jacks, T. (2004). Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 119, 847-860. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.004>.
- Oren, M., and Rotter, V. (2010). Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a001107. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001107>.
- Ozaki, T., and Nakagawara, A. (2005). p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. *Cancer science* 96, 729-737. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2005.00116.x>.
- Pajak, B., Siwiak, E., Sołtyka, M., Priebe, A., Zieliński, R., Fokt, I., Ziemiak, M., Jaśkiewicz, A., Borowski, R., and Domoradzki, T., et al. (2019). 2-Deoxy-d-Glucose and Its Analogs: From Diagnostic to Therapeutic Agents. *International journal of molecular sciences* 21, 234. <https://doi.org/10.3390/ijms21010234>.
- Pasternak, G., Hochhaus, A., Schultheis, B., and Hehlmann, R. (1998). Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects. *Journal of cancer research and clinical oncology* 124, 643-660. <https://doi.org/10.1007/s004320050228>.
- Post, S.M., Quintás-Cardama, A., Terzian, T., Smith, C., Eischen, C.M., and Lozano, G. (2010). p53-dependent senescence delays Emu-myc-induced B-cell lymphomagenesis. *Oncogene* 29, 1260-1269. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.423>.

- Riccardi, C., and Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols 1*, 1458-1461.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>.
- Roszkowska, K.A., Gizinski, S., Sady, M., Gajewski, Z., and Olszewski, M.B. (2020). Gain-of-Function Mutations in p53 in Cancer Invasiveness and Metastasis. *International journal of molecular sciences 21*. <https://doi.org/10.3390/ijms21041334>.
- Rufini, A., Agostini, M., Grespi, F., Tomasini, R., Sayan, B.S., Niklison-Chirou, M.V., Conforti, F., Velletri, T., Mastino, A., and Mak, T.W., et al. (2011). p73 in Cancer. *Genes Cancer 2*, 491-502. <https://doi.org/10.1177/1947601911408890>.
- Schwartzenberg-Bar-Yoseph, F., Armoni, M., and Karnieli, E. (2004). The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Research 64*, 2627-2633. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-0846>.
- Servier Medical Art (2022). Servier Medical Art.
<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>. 23.08.2022.
- Shangary, S., and Wang, S. (2009). Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annual review of pharmacology and toxicology 49*, 223-241.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094723>.
- Shen, L., Sun, X., Fu, Z., Yang, G., Li, J., and Yao, L. (2012). The fundamental role of the p53 pathway in tumor metabolism and its implication in tumor therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 18*, 1561-1567. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3040>.
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., and Pegram, M., et al. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England journal of medicine 344*, 783-792.
<https://doi.org/10.1056/NEJM200103153441101>.
- Stein, Y., Rotter, V., and Aloni-Grinstein, R. (2019). Gain-of-Function Mutant p53: All the Roads Lead to Tumorigenesis. *International journal of molecular sciences 20*.
<https://doi.org/10.3390/ijms20246197>.

Stindt, M.H., Muller, P.A.J., Ludwig, R.L., Kehrlöesser, S., Dötsch, V., and Vousden, K.H. (2015). Functional interplay between MDM2, p63/p73 and mutant p53. *Oncogene* 34, 4300-4310. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.359>.

Strano, S., Munarriz, E., Rossi, M., Cristofanelli, B., Shaul, Y., Castagnoli, L., Levine, A.J., Sacchi, A., Cesareni, G., and Oren, M., et al. (2000). Physical and functional interaction between p53 mutants and different isoforms of p73. *The Journal of biological chemistry* 275, 29503-29512. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003360200>.

Tajan, M., Hock, A.K., Blagih, J., Robertson, N.A., Labuschagne, C.F., Kruiswijk, F., Humpton, T.J., Adams, P.D., and Vousden, K.H. (2018). A Role for p53 in the Adaptation to Glutamine Starvation through the Expression of SLC1A3. *Cell Metab* 28, 721-736.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.005>.

(2022). The TP53 Database | ISB-CGC. <https://tp53.isb-cgc.org/>. 22.08.2022.

Tomasini, R., Tsuchihara, K., Wilhelm, M., Fujitani, M., Rufini, A., Cheung, C.C., Khan, F., Itie-Youten, A., Wakeham, A., and Tsao, M.-S., et al. (2008). TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev* 22, 2677-2691. <https://doi.org/10.1101/gad.1695308>.

Tran, T.Q., Lowman, X.H., Reid, M.A., Mendez-Dorantes, C., Pan, M., Yang, Y., and Kong, M. (2017). Tumor-associated mutant p53 promotes cancer cell survival upon glutamine deprivation through p21 induction. *Oncogene* 36, 1991-2001. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.360>.

van Nguyen, T., Puebla-Osorio, N., Pang, H., Dujka, M.E., and Zhu, C. (2007). DNA damage-induced cellular senescence is sufficient to suppress tumorigenesis: a mouse model. *The Journal of experimental medicine* 204, 1453-1461. <https://doi.org/10.1084/jem.20062453>.

Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., and Klein, C., et al. (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science (New York, N.Y.)* 303, 844-848. <https://doi.org/10.1126/science.1092472>.

Vikhreva, P., Melino, G., and Amelio, I. (2018). p73 Alternative Splicing: Exploring a Biological Role for the C-Terminal Isoforms. *J Mol Biol* 430, 1829-1838. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.04.034>.

Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310. <https://doi.org/10.1038/35042675>.

Wang, C.-Y., and Chao, C.-H. (2022). p53-Mediated Indirect Regulation on Cellular Metabolism: From the Mechanism of Pathogenesis to the Development of Cancer Therapeutics. *Frontiers in oncology* 12, 895112. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.895112>.

Wang, S., Zhao, Y., Aguilar, A., Bernard, D., and 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. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026245>.

Weissmueller, S., Manchado, E., Saborowski, M., Morris, J.P., Wagenblast, E., Davis, C.A., Moon, S.-H., Pfister, N.T., Tschaharganeh, D.F., and Kitzing, T., et al. (2014). Mutant p53 drives pancreatic cancer metastasis through cell-autonomous PDGF receptor β signaling. *Cell* 157, 382-394. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.066>.

Wilhelm, M.T., Rufini, A., Wetzel, M.K., Tsuchihara, K., Inoue, S., Tomasini, R., Itie-Youten, A., Wakeham, A., Arsenian-Henriksson, M., and Melino, G., et al. (2010). Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev* 24, 549-560. <https://doi.org/10.1101/gad.1873910>.

Xu, J., Reumers, J., Couceiro, J.R., Smet, F. de, Gallardo, R., Rudyak, S., Cornelis, A., Rozenski, J., Zwolinska, A., and Marine, J.-C., et al. (2011). Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nature Chemical Biology* 7, 285-295. <https://doi.org/10.1038/nchembio.546>.

Yoon, M.-K., Ha, J.-H., Lee, M.-S., and Chi, S.-W. (2015). Structure and apoptotic function of p73. *BMB Rep* 48, 81-90. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2015.48.2.255>.

Yoshikawa, K., Hamada, J., Tada, M., Kameyama, T., Nakagawa, K., Suzuki, Y., Ikawa, M., Hassan, N.M.M., Kitagawa, Y., and Moriuchi, T. (2010). Mutant p53 R248Q but not R248W enhances in vitro invasiveness of human lung cancer NCI-H1299 cells. *Biomedical research (Tokyo, Japan)* 31, 401-411. <https://doi.org/10.2220/biomedres.31.401>.

- Yue, X., Zhao, Y., Xu, Y., Zheng, M., Feng, Z., and Hu, W. (2017). Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy. *J Mol Biol* 429, 1595-1606. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.030>.
- Zhang, C., Liu, J., Liang, Y., Wu, R., Zhao, Y., Hong, X., Lin, M., Yu, H., Liu, L., and Levine, A.J., et al. (2013). Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect. *Nature communications* 4, 2935. <https://doi.org/10.1038/ncomms3935>.
- Zhang, J., Sun, W., Kong, X., Zhang, Y., Yang, H.J., Ren, C., Jiang, Y., Chen, M., and Chen, X. (2019). Mutant p53 antagonizes p63/p73-mediated tumor suppression via Notch1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 24259-24267. <https://doi.org/10.1073/pnas.1913919116>.
- Zhang, M., Heldin, A., Palomar-Siles, M., Öhlin, S., Bykov, V.J.N., and Wiman, K.G. (2017). Synergistic Rescue of Nonsense Mutant Tumor Suppressor p53 by Combination Treatment with Aminoglycosides and Mdm2 Inhibitors. *Frontiers in oncology* 7, 323. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00323>.
- Zhou, G., Wang, J., Zhao, M., Xie, T.-X., Tanaka, N., Sano, D., Patel, A.A., Ward, A.M., Sandulache, V.C., and Jasser, S.A., et al. (2014). Gain-of-function mutant p53 promotes cell growth and cancer cell metabolism via inhibition of AMPK activation. *Molecular cell* 54, 960-974. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.04.024>.
- Zhu, G., Pan, C., Bei, J.-X., Li, B., Liang, C., Xu, Y., and Fu, X. (2020). Mutant p53 in Cancer Progression and Targeted Therapies. *Frontiers in oncology* 10, 595187. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.595187>.

LEBENS LAUF

- Entfernt -

VERZEICHNIS AKADEMISCHER LEHRENDER

Meine akademischen Lehrenden in Marburg waren:

C. Bauer, U. Bauer, A. Becker, K. Becker, S. Becker, Bertoune, Bette, Bonaterra, Brandt, A. Brehm, C. Brehm, Brückner, Burchert, Cetin, Czubayko, Decher, Denkert, Dettmeyer, Duda, Eggers, Feuser, Gallmeier, Geraedts, Görg, Gress, Grosse, Haas, Halaszovich, Hertl, Hey, Hoffmann, Hoyer, Jansen, Jerrentrup, Kann, Kinscherf, Kluge, C. Köhler, S. Köhler, König, Kühnert, Lill, Lohoff, Lüsebrink, Mahnken, Maisner, Mandic, Meier, Moll, Müller, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oberwinkler, Oehr, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Pedrosa, Plant, Preisig-Müller, Reese, Renz, Richter, Riera, Rinke, Roelcke, Roessler, Rost, Ruchholtz, J. Schäfer, M. Schäfer, Schieffer, Schoner, Schröder, Schu, Schulze, Schütz, Schymalla, Seifart, Sekundo, Sevinc, Sharkova, Steiniger, Stiewe, Stuck, Thieme, Timmermann, Vogelmaier, von Zezschwitz, Vorwerk, C. Wächter, S. Wächter, Wagner, Wanzel, Weihe, Westermann, Wilhelm, Worzfeld, Wrocklage, Wulf.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich zuerst meinem Doktorvater Prof. Dr. Thorsten Stiewe für die Möglichkeit danken, an diesem spannenden Projekt zu arbeiten. Besonders dankbar bin ich für die gute Betreuung, Unterstützung, Ideen und Ratschläge.

Als nächstes möchte ich mich bei meinem Betreuer PD Dr. Michael Wanzel bedanken, der mir die absoluten Basics in der Laborarbeit gezeigt hat, geduldig mit mir war, immer ein offenes Ohr hatte und für angenehme und lustige Mittagspausen gesorgt hat.

Zusätzlich möchte ich mich bei Maria und Boris Klimovich, Julia Funk, Pascal Hunold und Aaron Dort bedanken, die mir ebenfalls viele Methoden gezeigt und erklärt haben.

Vielen Dank an die Core Facility „Genomics“ des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg und besonders Andrea Nist, Geli Filmer und Alexandra Schneider für die großartige Unterstützung bei den Aufreinigungen und der Durchführung der Sequenzierungen. Danke auch an Dr. Marco Mernberger für die Datenanalyse und Erklärung dieser.

Des Weiteren möchte ich mich bei den anderen Mitgliedern der AG Stiewe bedanken, die allzeit hilfsbereit, offen und freundlich waren, was die Zeit im Labor für mich sehr angenehm gemacht hat. Danke Björn, Nasti, Michelle, Sabrina, Saman, Marius, Miri, Siggie, Pier, Anjela, Antje, Oleg und Evangelos.

Zum Abschluss möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und Peter bedanken, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben sowie die Laborzeit und die Zeit des Schreibens geduldig mitverfolgt haben. Danke Papa, für das häufige Korrekturlesen.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

- Entfernt -