Aus dem Institut für Molekulare Onkologie
(Prof. Dr. med. M. Dobbelstein)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Rolle des Tumorsuppressors p53 in der ungestörten S-Phase

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Leonie Maria Müller

aus

Bad Wildungen

Göttingen 2020

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in	Prof. Dr. med. M. Dobbelstein
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. Heidi Eva Hahn

Datum der mündlichen Prüfung: 12.01.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Rolle des Tumorsuppressors p53 in der ungestörten S-Phase" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den …… ……

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Klusmann I, Rodewald S, Müller L, Friedrich M, Wienken M, Li Y, Schulz-Heddergott R, Dobbelstein M (2016): p53 Activity Results in DNA Replication Fork Processivity. Cell Rep 17, 1845–1857

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis ..... **IV**

Tabellenverzeichnis ..... **V**

Abkürzungsverzeichnis ..... **VII**

1 Einleitung **1**

1.1 Das Tumorsuppressorgen p53 1
1.1.1 Struktur und zelluläre Regulationsmechanismen 1
1.1.2 p53 hat vielfältige Funktionen innerhalb der Zelle 2
1.2 p53 und Krebs 6
1.3 Hinweise auf eine präventive Funktion des Tumorsuppressors p53 7
1.4 Die Rolle von p53 während der ungestörten S-Phase ist unklar 8
1.5 Fragestellung 10

2 Material und Methoden **11**

2.1 Material 11
2.1.1 Geräte 11
2.1.2 Software 13
2.1.3 Verbrauchsmaterialien 14
2.1.4 Chemikalien und Reagenzien 15
2.1.5 Enzyme und zugehörige Puffer 17
2.1.6 Kits 18
2.1.7 Chemotherapeutika 18
2.1.8 Oligonukleotide (Primer) 18
2.1.9 Antikörper 19
2.1.10 Zelllinie 20
2.1.11 Medium für die Zellkultur 20
2.1.12 Puffer und Lösungen 20
2.2 Methoden 24
2.2.1 Zellbiologische Methoden 24
2.2.2 Molekularbiologische Methoden unter Verwendung von RNA 27
2.2.3 Molekularbiologische Methoden unter Verwendung von Proteinen 35
2.2.4 Analyse der Replikationstätigkeit von U2OS-Zellen mittels EdU-Inkorporation und Detektion in der High-Content-Fluoreszenzmikroskopie 39
2.2.5 Durchflusszytometrische Bestimmung des DNA-Gehalts von U2OS-Zellen 40

3 Ergebnisse **43**

3.1 Nutlin-3 induziert das p53-responsive Gen *p21* (*CDKN1A*) und verhindert den Eintritt in die S-Phase erst nach langer Behandlungsdauer 43
3.1.1 Die Behandlung mit Nutlin-3 führt zur Induktion des p53-responsiven Gens *p21* (*CDKN1A*) in U2OS-Zellen 43

3.1.2 Die Behandlung von U2OS-Zellen mit Nutlin-3 verhindert den Eintritt in die S-Phase erst nach langer Inkubationsdauer 45

3.2 Die Anwendung eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert U2OS-Zellen am G1/S-Übergang 47

3.3 Eine Nutlin-3-Behandlung während der S-Phase verhindert nicht das Voranschreiten der DNA-Replikation in U2OS-Zellen 49

3.4 Die Behandlung mit Nutlin-3 während der S-Phase führt ebenfalls zu einer signifikanten Induktion des p53-responsiven Gens *p21* (*CDKN1A*) in U2OS-Zellen 52

3.5 Die Behandlung mit Nutlin-3 während der S-Phase führt auf Proteinebene zur Akkumulation von p53 und p21 in U2OS-Zellen 53

3.6 Die Behandlung mit Nutlin-3 während der S-Phase induziert weitere bekannte p53-responsive Gene in U2OS-Zellen 56

3.6.1 Die Behandlung mit Nutlin-3 während der S-Phase induziert die Expression des p53-responsiven Gens *PUMA* (*BBC3*) auf mRNA-Ebene in U2OS-Zellen 56

3.6.2 Die Behandlung mit Nutlin-3 während der S-Phase induziert schwach die Expression des p53-responsiven Gens *PCNA* auf mRNA-Ebene in U2OS-Zellen 57

3.6.3 Die Behandlung mit Nutlin-3 während der S-Phase induziert die Expression des p53-responsiven Gens *14-3-3σ* (*SFN*) auf mRNA-Ebene in U2OS-Zellen 58

3.6.4 Die Behandlung mit Nutlin-3 während der S-Phase induziert die Expression des p53-responsiven Gens *p53R2* (*RRM2B*) auf mRNA-Ebene in U2OS-Zellen 59

3.7 Eine Prä-Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin-3 während der letzten Stunden eines Thymidin-Blocks verhindert nicht das anschließende Eintreten der Zellen in die S-Phase 61

3.8 Die Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin-3 hat einen Einfluss auf die Replikationsrate der einzelnen Zellen in verschiedenen Abschnitten der S-Phase 65

3.8.1 Die Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin-3 verringert die Replikationsrate der einzelnen Zellen zu den Zeitpunkten 4, 6 und 8 h nach Aufhebung eines doppelten Thymidin-Blocks 66

3.8.2 Die Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin-3 verringert die Replikationsrate der einzelnen Zellen zum Zeitpunkt 2 h nach Aufhebung eines doppelten Thymidin-Blocks 71

3.8.3 Die Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin-3 verringert die Replikationsrate der einzelnen Zellen zu den Zeitpunkten 3, 4 und 5 h nach Aufhebung eines doppelten Thymidin-Blocks 73

3.8.4 Die Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin-3 verringert die Replikationsrate der einzelnen Zellen zu den Zeitpunkten 8, 10 und 12 h nach Aufhebung eines doppelten Thymidin-Blocks 76

3.9 Die Prä-Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin-3 während der letzten Stunden eines Thymidin-Blocks führt zu einer Induktion p53-responsiver Gene in der anschließenden S-Phase 79

3.10 Die Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin-3 führt sowohl in asynchronen Zellen als auch während der ungestörten S-Phase zu einer p53-mediierten Induktion einer Vielzahl verschiedener Gene 84

3.11 Die Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin oder Gemcitabin während der S-Phase führt auf mRNA-Ebene zu Unterschieden in der Expression p53-responsiver Gene 86

3.12 Die Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin oder Gemcitabin während der S-Phase führt auf Proteinebene zu Unterschieden in der zellulären Reaktion auf die Akkumulation von p53 91

4 Diskussion 94

4.1 Abgleich der Ergebnisse mit der Literatur und Einordnung in einen größeren Zusammenhang 94

4.2 Kritische Betrachtung der Arbeit 100

4.3 Mögliche Folgeexperimente 102

5 Zusammenfassung 105

6 Literaturverzeichnis 106

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Normalisierung der qPCR-Daten auf das Haushaltsgen *36B4* 33

Abbildung 2: Behandlung von U2OS-Zellen mit Nutlin-3: Expression des p53-responsiven Gens *p21* (*CDKN1A*) 44

Abbildung 3: Behandlung von U2OS-Zellen mit Nutlin-3: Einfluss auf DNA-Replikation 46

Abbildung 4: Anwendung eines doppelten Thymidin-Blocks zur Synchronisation von U2OS-Zellen: Darstellung des DNA-Gehalts mittels Durchflusszytometrie 48

Abbildung 5: Nutlin-3-Behandlung von U2OS-Zellen nach Aufhebung des Thymidin-Blocks: Darstellung der Replikationstätigkeit anhand der Inkorporation von EdU 51

Abbildung 6: Nutlin-3-Behandlung von asynchronen und synchronisierten, sich bereits in der S-Phase befindenden U2OS-Zellen: Genexpression von *p21* (*CDKN1A*) 53

Abbildung 7: Nutlin-3-Behandlung von asynchronen und synchronisierten, sich bereits in der S-Phase befindenden U2OS-Zellen: Betrachtung der Wirkung auf Proteinebene 55

Abbildung 8: Nutlin-3-Behandlung von asynchronen und synchronisierten, sich bereits in der S-Phase befindenden U2OS-Zellen: Genexpression wichtiger p53-responsiver Gene 60

Abbildung 9: Einfluss einer Prä-Inkubation mit Nutlin-3 auf die S-Phase in U2OS-Zellen: FACS-Analyse zur Bestimmung der Replikationstätigkeit 64

Abbildung 10: Einfluss einer Prä-Inkubation mit Nutlin-3 und anschließend für 4,6 und 8 h weitergeführter Inkubation auf die Replikation im Verlauf der S-Phase und in asynchronen Zellen 70

Abbildung 11: Einfluss einer Prä-Inkubation mit Nutlin-3 und anschließend für 2 h weitergeführter Inkubation auf die Replikation im Verlauf der S-Phase und in asynchronen Zellen 72

Abbildung 12: Einfluss einer Prä-Inkubation mit Nutlin-3 und anschließend für 3, 4 und 5 h weitergeführter Inkubation auf die Replikation im Verlauf der S-Phase und in asynchronen Zellen 75

Abbildung 13: Einfluss einer Prä-Inkubation mit Nutlin-3 und anschließend für 8, 10 und 12 h weitergeführter Inkubation auf die Replikation im Verlauf der S-Phase und in asynchronen Zellen 78

Abbildung 14: Genexpression von *p21* (*CDKN1A*) nach Prä-Inkubation und weitergeführter Inkubation mit Nutlin-3 in asynchronen und synchronisierten U2OS-Zellen 80

Abbildung 15: Genexpression verschiedener p53-responsiver Gene nach Prä-Inkubation und weitergeführter Inkubation mit Nutlin-3 von asynchronen und synchronisierten U2OS-Zellen 83

Abbildung 16: Nutlin-3-Behandlung von asynchronen und synchronisierten, zu Beginn der S-Phase blockierten sowie in der S-Phase befindlichen U2OS-Zellen: Betrachtung der Geninduktion durch p53 mittels RNA-Sequenzierung 85

Abbildung 17: Behandlung mit Nutlin-3, Gemcitabin und einer Kombination in asynchronen und U2OS-Zellen in der S-Phase: Genexpression wichtiger p53-responsiver Gene 90

Abbildung 18: Behandlung asynchroner und synchronisierter, sich in der S-Phase befindender U2OS-Zellen mit Nutlin-3, Gemcitabin sowie einer Kombination: Betrachtung des Effekts auf Proteinebene 93

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte 11
Tabelle 2: Software 13
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien 14
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien 15
Tabelle 5: Enzyme und zugehörige Puffer 17
Tabelle 6: Kits 18
Tabelle 7: Chemotherapeutika 18
Tabelle 8: Oligonukleotide (Primer) 18
Tabelle 9: Primärantikörper 19
Tabelle 10: Sekundärantikörper 19
Tabelle 11: Zelllinie 20
Tabelle 12: Zusammensetzung DMEM ohne Zusatz 20
Tabelle 13: Zusammensetzung DMEM mit Zusatz 20
Tabelle 14: Zusammensetzung PCR-Ansatz 20
Tabelle 15: Zusammensetzung PCR-Master-Mix 21
Tabelle 16: Zusammensetzung RIPA-Puffer 21
Tabelle 17: Zusammensetzung Lyse-Puffer für die Proteinextraktion 21
Tabelle 18: Zusammensetzung Laemmli-Puffer 22
Tabelle 19: Zusammensetzung Western-Salts-Lösung 22
Tabelle 20: Zusammensetzung TBS 22
Tabelle 21: Zusammensetzung TBS-T 22
Tabelle 22: Zusammensetzung Blocking-Lösung für Western Blot 22
Tabelle 23: Zusammensetzung PBS 23
Tabelle 24: Zusammensetzung SDS-Laufpuffer für Gelelektrophorese 23
Tabelle 25: Zusammensetzung Ponceau-S-Lösung 23
Tabelle 26: Zusammensetzung Transfer-Puffer für Western Blot 23
Tabelle 27: Zusammensetzung Fixierungs-Lösung für EdU-Fluoreszenzmikroskopie 23
Tabelle 28: Zusammensetzung Permeabilisierungs-Lösung für EdU-Fluoreszenzmikroskopie 24
Tabelle 29: Zusammensetzung Reaktionsansatz I zur Durchführung einer reversen Transkription 30
Tabelle 30: Zusammensetzung Reaktionsansatz II zur Durchführung einer reversen Transkription 30
Tabelle 31: Protokoll der reversen Transkription 30
Tabelle 32: Zusammensetzung Reaktionsansatz qPCR 31
Tabelle 33: Einzelne Schritte der qPCR 32
Tabelle 34: Zusammensetzung Trenngel für SDS-PAGE 37

Tabelle 35: Zusammensetzung Sammelgel für SDS-PAGE.....37
Tabelle 36: Verwendete Bezeichnungen für untersuchte Zeitabschnitte der S-Phase.....66

Abkürzungsverzeichnis

AdTB	Aufhebung des Thymidin-Blocks
APS	Ammoniumpersulfat
BAX	*BCL-2-associated X protein*
BCA	*bicinchoninic acid*, Bicinchoninsäure
BCL-2	*B-cell lymphoma 2*
BH3-only	*BCL-2 homology domain 3 only*
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cdk	*cyclin-dependent kinase*, Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	komplementäre DNA
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dH_2O	destilliertes Wasser
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle's medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EdU	5-Ethynyl-2‘-deoxyuridine
FACS	*fluorescence-activated cell sorting*
FADD	*FAS-associated protein with death domain*
FAS	*first apoptotic signal*
FCS	*fetal calf serum*
GADD45A	*growth arrest and DNA damage-inducible protein A*
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPV	humane Papillomaviren
HRP	*horseradish peroxidase*
HSC70	*heat shock cognate 71 kDa protein*
MDM2	*mouse mouble minute 2 homolog*
M-MuLV	*Moloney murine leukemia virus*
mRNA	*messenger*-RNA
n.s.	nicht signifikant
p. a.	*pro analysi*
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	*phosphate-buffered saline,* phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	*proliferating cell nuclear antigen*
PCR	*polymerase chain reaction*
PI	Propidiumiodid
PIG3	*p53-inducible gene 3*
PUMA	*P53 upregulated mediator of apoptosis*
qPCR	quantitative Realtime-PCR
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase -PCR
RIPA-Puffer	*Radio-Immunoprecipitation-Assay*-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	*revolutions per minute*, Umdrehungen pro Minute
RRM2B	Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase M2B
SDS	*sodium dodecyl sulfate*, Natriumlaurylsulfat
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

1.1 Das Tumorsuppressorgen p53

p53 ist eines der wichtigsten bekannten Tumorsuppressorgene. Seit seiner Entdeckung im Jahr 1979 ist es Gegenstand intensiver Forschung, die ein komplexes Netzwerk an Informationen hervorgebracht hat und die besondere Bedeutung dieses Gens unterstreicht.

1.1.1 Struktur und zelluläre Regulationsmechanismen

Die Gensequenz für p53 ist in den meisten vielzelligen Organismen hoch konserviert (Giono und Manfredi 2006). Sie befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17, genauer 17p13.1, und kodiert für das etwa 43,7 kDa große Protein. Die meisten seiner vielschichtigen Funktionen führt p53 als Transkriptionsfaktor aus: Es besitzt eine zentrale DNA-Bindungsstelle, mit der es direkt an spezifische DNA-Sequenzen binden und somit die Transkription von Zielgenen beeinflussen kann (Levine und Oren 2009). Doch auch direkte, transkriptionsunabhängige Funktionsmechanismen sind bekannt, beispielsweise durch direkte Interaktion mit der Mitochondrienmembran in der Apoptoseinduktion (Mihara et al. 2003).

In einer ruhenden Zelle ist der p53-Spiegel meist niedrig (Danova et al. 1990). Der wichtigste negative Regulator des Tumorsuppressors ist das Protein MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*), das p53 an dessen N-terminalem Ende binden und so transkriptionell inaktiv halten kann. MDM2 fungiert zudem als Ubiquitin-Ligase und sorgt somit für eine proteasomvermittelte Degradation von p53 (Kubbutat et al. 1997). Diese p53-MDM2-Interaktion erfolgt im Rahmen einer negativen Feedback-Schleife, da p53 als Transkriptionsfaktor auch die Produktion seines negativen Regulators induziert (Iwakuma und Lozano 2003).

Die Aktivierung von p53 erfolgt durch verschiedene Auslöser, denen ein potentieller negativer Einfluss auf die Integrität der Zelle und des Organismus gemeinsam ist. Dies sind beispielsweise DNA-Schäden, onkogene Viren, Hypoxie, UV- oder Gamma-Bestrahlung (Giono und Manfredi 2006; Levine und Oren 2009). Durch verschiedene zelluläre Mechanismen wie posttranskriptionelle Modifikation und die Unterbrechung der MDM2-p53-Interaktion wird p53 daraufhin stabilisiert und es kommt zu einem Anstieg des intrazellulären Spiegels (Kruse und Gu 2009). Es wird angenommen, dass Art und Ausmaß

des aktivierenden Stimulus, Mechanismus der p53-Aktivierung, Höhe des p53-Spiegels, sowie der Zell- und Gewebetyp die jeweilige zelluläre Antwort beeinflussen (Vousden 2000; Inga et al. 2002).

1.1.2 **p53 hat vielfältige Funktionen innerhalb der Zelle**

Die wichtigste und grundlegendste Funktion des Tumorsuppressors p53 ist es, die abnorme Proliferation von Zellen zu verhindern. Repliziert eine Zelle beispielsweise geschädigte DNA, kann es im weiteren Verlauf zu einer raschen Akkumulation chromosomaler Aberrationen kommen und zu zunehmender genetischer Instabilität. Die maligne Entartung durch unkontrollierte Proliferation ist eine häufige Folge dieses Prozesses (Lengauer et al. 1998). Auch die unkontrolliert stimulierte Proliferation durch virale oder aktivierte endogene Onkogene kann zur Tumorigenese beitragen (Rhim 1988).
Tritt ein zellschädigendes Ereignis ein, bestehen im Wesentlichen drei verschiedene Möglichkeiten der Intervention durch p53: Es kann erstens einen vorübergehenden Arrest des Zellzyklus bewirken, um der Zelle Zeit zur Reparatur eines DNA-Schadens einzuräumen. Eine zweite Möglichkeit ist die Seneszenz: Die Zelle überlebt, wird jedoch in einen replikativ inaktiven Ruhezustand versetzt und kann somit keine weiteren Zellteilungen mehr durchlaufen (Serrano et al. 1997). Als letzte Option bleibt bei irreversiblem Schaden die Induktion der Apoptose durch p53.
Eine Übersicht über diese zentralen Funktionen des Tumorsuppressors p53 geben die folgenden Kapitel.

1.1.2.1 p53 kann einen Arrest des Zellzyklus aufrechterhalten

Der geordnete Ablauf des Zellzyklus ist essentiell für die genetische Stabilität einer Zelle und wird durch sogenannte Checkpunkte streng kontrolliert. Der Fortschritt innerhalb oder der Übergang von einer zur nächsten Phase des Zyklus ist dabei nur dann möglich, wenn die vorigen Schritte vollständig und fehlerlos abgeschlossen sind. Dieser Prozess wird maßgeblich durch regulatorische Proteine, Cycline und cyclinabhängige Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, cdk), mediiert. Durch das Auftreten genotoxischer Einflüsse können die Checkpunkte aktiviert werden und das Fortschreiten des Zyklus verzögern oder stoppen. p53 nimmt durch seine Beteiligung insbesondere am G1/S-Checkpunkt eine zentrale Rolle in der Regulierung des Zellzyklus ein. Da seine Funktion transkriptionelle Aktivität und somit eine gewisse Zeit erfordert, dient es weniger der Initiierung, sondern vor allem dem

Erhalt des jeweiligen Checkpunktes, um so ein Zeitfenster zur Behebung des Zellschadens zur Verfügung zu stellen (Nyberg et al. 2002).

Während der G1-Phase bereitet sich eine Zelle auf die Replikation ihrer DNA vor. Werden in dieser Phase DNA-Schäden detektiert, so kommt es durch die Aktivierung von p53 zur verstärkten Expression des p53-Zielgens *p21* (auch *CDKN1A*). Das p21-Protein blockiert als cdk-Inhibitor den Eintritt in die darauffolgende S-Phase und unterhält somit den p53-abhängigen G1/S-Arrest (Giono und Manfredi 2006).

In ähnlicher Weise ist p53 auch an einem G2/M-Checkpunkt beteiligt, der sicherstellen soll, dass Zellen mit quantitativ oder qualitativ fehlerhaft replizierter DNA nicht in die Mitose eintreten. Über eine p53-abhängige Induktion der Proteine 14-3-3σ, GADD45A (*growth arrest and DNA damage-inducible protein A*) und ebenfalls p21 kann bei vorliegendem DNA-Schaden die Cyclin-cdk-Interaktion negativ beeinflusst und somit ein weiterer Zellzyklusarrest aufrecht erhalten werden (Giono und Manfredi 2006).

1.1.2.2 p53 ist an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt

Eng verknüpft mit dem System der Checkpunkte zur Arretierung des Zellzyklus bei genotoxischem Stress ist die DNA-Reparatur. Der Tumorsuppressor p53 stellt durch seine Beteiligung an den G1/S- und G2/M-Checkpunkten nicht nur ein Zeitfenster zum Beheben des Schadens zur Verfügung, er kann über die Induktion verschiedener Zielgene auch regulierend in die Mechanismen der DNA-Reparatur eingreifen (Giono und Manfredi 2006).

Ein sowohl an der DNA-Reparatur als auch der DNA-Replikation beteiligtes Protein ist *proliferating cell nuclear antigen*, kurz PCNA. Es kann in Form eines Homotrimers als Ringklemme doppelsträngige DNA binden und an ihr entlang gleiten. Dabei rekrutiert es eine Vielzahl an weiteren Proteinen, insbesondere DNA-Polymerasen oder spezielle Mediatoren der DNA-Reparatur, und führt Funktionen innerhalb der Nukleotidexzisions-, Mismatch- sowie Basenexzisonsreparatur aus (Maga und Hübscher 2003). Als Reaktion auf einen DNA-Schaden kann das p53-induzierte Protein p21 an PCNA binden und dessen Replikations-Aktivität blockieren zugunsten einer intensivierten Nukleotidexzisons-reparatur-Aktivität (Li et al. 1994).

Auch die Expression von PCNA selbst kann durch p53 in Folge eines DNA-Schadens durch ionisierende Strahlung induziert werden. Dies geschieht jedoch in geringerem Ausmaß als die Induktion von p21. Es wird vermutet, dass über diesen Mechanismus die

Aufrechterhaltung eines funktionierenden p21/PCNA-Verhältnisses erreicht werden soll, um die DNA-Reparatur zu unterstützen (Shan et al. 2003).

Eine von PCNA unabhängige Beteiligung von p53 an der DNA-Reparatur besteht über sein Zielgen *RRM2B* (Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase M2B, auch *p53R2*): Verschiedene genotoxische Einflüsse wie Gamma-, UV-Strahlung oder DNA-schädigende Agenzien führen über die Aktivierung von p53 zur verstärkten Expression der Ribonukleotidreduktase p53R2. Diese ähnelt der kleinen Untereinheit R2 der Ribonukleotidreduktase, die im Zytoplasma lokalisiert ist und Nukleotide zur Replikation der DNA bereitstellt. p53R2 dagegen befindet sich nach seiner p53-abhängigen Induktion im Nukleus und kann dort gezielt am Ort des Schadens Nukleotide zur Reparatur bereitstellen (Tanaka et al. 2000).

1.1.2.3 p53 kann eine Zelle in die Seneszenz überführen

Seneszenz bezeichnet einen unter normalen Umständen irreversiblen zellulären Ruhezustand, in dem keine weiteren Zellteilungen mehr möglich sind. Dieser Zustand kann auf physiologische Weise erreicht werden, wenn eine Zelle die ihr maximal zur Verfügung stehende Anzahl an Zellteilungen vollzogen hat und ihre Telomere auf eine kritische Länge gekürzt sind (dies löst eine Signalkaskade aus, innerhalb derer Doppelstrangbrüche der DNA auftreten), und wird dementsprechend replikative Seneszenz genannt (d'Adda di Fagagna 2008; Rufini et al. 2013).

Im Gegensatz dazu tritt die sogenannte Onkogen-induzierte Seneszenz ein, wenn (unabhängig von der Anzahl der bisher erfolgten Zellteilungen) durch die Aktivierung eines Onkogens zunächst eine Hyperproliferation der Zelle mit zunehmender Akkumulation von DNA-Schäden bei aberranter Replikation auftritt (Micco et al. 2006). Auch genotoxischer Stress kann über eine Schädigung der DNA zur Seneszenz führen, in diesem Fall zu Stress-induzierter Seneszenz (Qian und Chen 2010). In allen drei Mechanismen kommt es zur Auslösung einer DNA-Schadensantwort und die Zelle wird an der Durchführung weiterer replikativer Zyklen gehindert (d'Adda di Fagagna 2008; Rufini et al. 2013).

Über seine Aktivität als Transkriptionsfaktor ist p53 direkt an der Induktion der Seneszenz beteiligt (Bond et al. 1996). Es konnte zudem gezeigt werden, dass p53 unter bestimmten Umständen essentiell ist für deren Aufrechterhaltung, da seneszente Zellen nach p53-Inaktivierung wieder einen replikativen Zustand erlangten (Beauséjour et al. 2003). Obwohl die genauen Mechanismen noch weitgehend unklar sind, gibt es Hinweise, dass ebenso wie beim reversiblen Zellzyklusarrest auch in der Seneszenz das p53-responsive Gen p21 eine

wesentliche Rolle innehat (Brown et al. 1997; Wang et al. 1999; Jackson und Pereira-Smith 2006).

1.1.2.4 p53 kann die Apoptose einer Zelle induzieren

Erreicht die Schädigung einer Zelle ein irreparables Ausmaß, fehlen überlebenswichtige Ressourcen oder stimuliert ein aktiviertes (virales) Onkogen die Replikation auf unkontrollierte Weise, so kann p53 über die Induktion der Apoptose diese Zelle eliminieren (Levine 1997).

Generell kann die Apoptose über zwei zentrale Auslösemechanismen induziert werden, die in einer gemeinsamen Endstrecke münden. Der erste Mechanismus, auch als intrinsischer Weg bezeichnet, wird vorwiegend durch interne Stresssignale der Zelle ausgelöst. In der äußeren Mitochondrienmembran einer ungestörten Zelle überwiegen die Einflüsse anti-apoptotischer Proteine der BCL-2-Familie (*B-cell lymphoma 2*) gegenüber denen der ebenfalls dort lokalisierten pro-apoptotischen Proteine derselben Familie, wie beispielsweise BAX (*BCL-2-associated X protein*). Durch die Induktion pro-apoptotischer BH3(*BCL-2 homology domain 3*)-*only*-Proteine bei zellulärem Stress kommt es zu einer Umkehr dieses Kräfte-verhältnisses. Die äußere Mitochondrienmembran wird permeabilisiert und es werden Apoptose-Mediatoren wie Cytochrom c ins Zytoplasma freigesetzt. Über die kaskadenartige Aktivierung proteolytischer Caspasen wird der Zelltod schließlich umgesetzt (Aubrey et al. 2018).

Der zweite, extrinsische, Mechanismus wird über plasmamembrangebundene Todes-rezeptoren, beispielsweise FAS (*first apoptotic signal*), vermittelt. Durch Ligandenbindung trimerisieren die Rezeptoren und rekrutieren über den intrazellulären Adapter FADD (*FAS-associated protein with death domain*) Caspasen. Im Sinne der gemeinsamen Endstrecke werden diese daraufhin aktiviert (Aubrey et al. 2018).

Über die Induktion verschiedener pro-apoptotischer Proteine der BH3-only-Gruppe leistet p53 einen wesentlichen Beitrag zur Apoptoseinduktion bei genotoxischem Stress. So sind beispielsweise die Gene *PUMA* (*p53-upregulated mediator of apoptosis*, auch *BBC3*) und *Noxa* wichtige p53-responsive Mediatoren der Apoptose (Nakano und Vousden 2001; Shibue et al. 2003).

Über die Induktion des FAS-Todesrezeptors ist p53 zudem am extrinsischen Weg der Apoptoseinduktion beteiligt (Müller et al. 1998). Wie zuvor bereits erwähnt, kann p53 über eine direkte Interaktion mit der Mitochondrienmembran auch transkriptionsunabhängig zur Apoptose einer Zelle beitragen (Mihara et al. 2003).

1.2 p53 und Krebs

p53 spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Krebserkrankungen. In etwa 50% aller malignen Neoplasien finden sich p53-Mutationen und diese können in praktisch jeder Art eines Malignoms vorkommen. Am häufigsten handelt es sich dabei um Punktmutationen, die zu einem Aminosäureaustausch in der zentralen DNA-bindenden Domäne des Proteins mit konsekutivem Verlust der Bindungskapazität führen. Obwohl meist zunächst nur ein Allel betroffen ist, kommt es durch Komplexbildung des mutierten Proteins mit dem Wildtyp zur dominant negativen Beeinträchtigung der p53-Funktion. Auch mutierte Genprodukte mit aktiv tumorfördernden Eigenschaften sind bekannt. Oft kommt es im weiteren Verlauf zum sogenannten Verlust der Heterozygosität, indem das verbliebene wildtypische Allel durch Deletion oder anderweitige Mutationen inaktiviert wird. (Rivlin et al. 2011)

In den Patienten mit homozygot wildtypischem p53 ist dieses in seiner Funktion dennoch oft durch Mutationen von MDM2 oder durch die Interaktion mit onkogenen Viren gestört (Soussi und Wiman 2007). Durch das Ausschalten des zentralen p53-mediierten Schutzmechanismus der Zelle ist in vielen Fällen der Weg geebnet für eine beschleunigte Akkumulation weiterer Mutationen und chromosomaler Aberrationen im Rahmen einer zunehmenden genetischen Instabilität.

Patienten mit dem Li-Fraumeni-Syndrom, die eine p53-Keimzellmutation tragen, entwickeln oft schon in jungen Jahren Krebserkrankungen wie Sarkome, prämenopausale Mammakarzinome, maligne Hirntumore, Nebennierenrindenkarzinome oder Leukämien (Kamihara et al. 2014).

Auch in der von Vogelstein beschriebenen Adenom-Karzinom-Sequenz in der Entstehung von kolorektalen Karzinomen kommt dem Verlust von wildtypischem p53 eine entscheidende Bedeutung zu (Cho und Vogelstein 1992). Für diese Karzinome konnte gezeigt werden, dass eine p53-Mutation im Zusammenhang mit einer Deletion des verbliebenen Allels ein relativ spätes Ereignis im Verlauf der malignen Entartung darstellt (Baker et al. 1990).

Bei der Beurteilung von Leukämien sind solche Erkrankungen mit mutiertem oder deletiertem p53 in aller Regel mit einer schlechten Prognose assoziiert (Stengel et al. 2017).

Auch an der Tumorigenese durch die onkogenen Humanen Papillomaviren HPV 16 und 18 ist p53 beteiligt. Durch das viruscodierte Onkoprotein E6 wird der Tumorsuppressor

gebunden und einer proteasomvermittelten Degradation zugeführt, was zur Entstehung von Gebärmutterhalskrebs und anderen Malignomen führen kann (Scheffner et al. 1990).
Durch diese breit gefächerte Beteiligung an den verschiedensten Krebserkrankungen ist p53 von enormer Bedeutung für die onkologische Forschung. Nicht nur als direktes therapeutisches Ziel ist es dabei interessant, auch die Erforschung von synergistischen oder antagonistischen Effekten im Zusammenhang mit bereits etablierten Therapien spielt eine entscheidende Rolle.

1.3 Hinweise auf eine präventive Funktion des Tumorsuppressors p53

Seit nunmehr 40 Jahren kreist ein nicht unerheblicher Anteil der onkologischen Forschung um den Tumorsuppressor p53 und mit vielen neuen Entdeckungen scheint sich ein immer komplexeres Bild der bekannten Zusammenhänge abzuzeichnen (s. hierzu die Übersichtsartikel von Levine und Oren 2009, Vousden und Prives 2009): Zunächst als Onkogen fehlinterpretiert, wandelte sich p53 zur Schlüsselfigur der Tumorsuppression – aufgrund seiner vielfältigen Beteiligung an zentralen Mechanismen zum Schutz der Zelle wurde es gar als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane 1992). Doch die Charakterisierung dieses Gens und seiner Funktionen hat sich noch lange nicht erschöpft und fördert immer weitere, unerwartete Erkenntnisse zutage. So konnte mittlerweile gezeigt werden, dass p53 nicht nur in seiner klassischen Rolle als Tumorsuppressor an der Induktion von Zellzyklusarrest, Seneszenz oder Apoptose wesentlich mitwirkt, sondern auch an einer Vielzahl davon unabhängiger Prozesse beteiligt ist (Bieging et al. 2014): Das Spektrum der p53-Aktivitäten umfasst unter anderem metabolische Prozesse (Gottlieb und Vousden 2010), Autophagie (White 2016), Modulationen des Immunsystems (Menendez et al. 2013), Stammzelldifferenzierung (Yi et al. 2012), Einfluss auf die Reproduktion (Levine et al. 2011) und reicht bis zum natürlichen Alterungsprozess (Rufini et al. 2013).
Es scheint also, als ob das klassische Modell des „Wächters des Genoms“ erweitert werden müsste. Es handelt sich dabei um ein Modell, das die *ex-post*-Funktion von p53 betont: Die Antwort des Tumorsuppressors auf einen bereits eingetretenen Schaden stellt darin seine wichtigste antineoplastische Eigenschaft dar. Aus generellen Überlegungen heraus wäre jedoch ein *ex-ante*-Modell für die Integrität einer Zelle und des gesamten Organismus weitaus lohnenswerter: Die Verhinderung eines Schadens durch die Unterstützung einer normalen Zellfunktion könnte wesentlich früher und effektiver zur Tumorsuppression

beitragen. Hinweise auf eine präventive Funktion des p53-Proteins ergeben sich aus den nachfolgend beschriebenen Beobachtungen.

Betrachtet man Mäuse, die kein funktionierendes Allel für p53 besitzen, so entwickeln sich diese zwar augenscheinlich normal, zeigen jedoch bereits in jungem Alter eine hohe Anfälligkeit für Tumorerkrankungen (Donehower et al. 1992) und bestätigen damit die Relevanz des Tumorsuppressors. Interessant ist jedoch, dass Mäuse, die durch gezielte Mutationen an p53-Zielgenen ihre Fähigkeiten zur p53-mediierten Apoptose, Seneszenz und zum Zellzyklusarrest verloren haben, dennoch keine erhöhte Rate an Tumoren aufweisen (Li et al. 2012; Valente et al. 2013). Es konnte zudem gezeigt werden, dass DNA-Schäden nach Bestrahlung in Zellen ohne p53 länger anhielten als in Zellen, die lediglich defizient für die p53-induzierbaren Gene *p21*, *PUMA* und *Noxa* waren (Valente et al. 2013). Dies deutet darauf hin, dass p53 auch über andere Mechanismen als die drei klassischen *ex-post*-Reaktionen auf einen genotoxischen Schaden seine tumorsuppressiven Eigenschaften ausüben kann.

Eine andere wissenschaftliche Arbeit konnte zeigen, dass in bestimmten malignen Tumoren von Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom, bei denen eine p53-Keimzellmutation vorliegt, sowie in Fällen von akuter myeloischer Leukämie mit komplexem Karyotyp und p53-Inaktivierung signifikant häufiger Merkmale einer Chromothripsis vorliegen als in solchen Malignomen mit intaktem p53 (Rausch et al. 2012). Es handelt sich dabei um eine extreme Variante genetischer Aberrationen mit multiplen Rearrangements innerhalb eines Chromosoms und Verbindungen einzelner Chromosomen untereinander, die während eines einzigen Ereignisses durch die Zerstückelung eines Chromosomenabschnitts entstehen und insgesamt selten sind (Stephens et al. 2011). Es stellt sich die Frage, ob vor dem Hintergrund der oben beschriebenen Ergebnisse von Li und Valente allein der Ausfall der DNA-Schadensantwort von p53 für eine solche Häufung katastrophaler Schadensereignisse verantwortlich ist, oder ob die Beteiligung von p53 an der Prävention eines solchen Ereignisses nicht ebenfalls maßgeblich sein könnte.

1.4 Die Rolle von p53 während der ungestörten S-Phase ist unklar

Eine präventive Funktion des Tumorsuppressors p53 wäre im Sinne eines *ex-ante*-Modells am ehesten in solchen zellulären Prozessen zu erwarten, in denen die Zelle schädigenden Einflüssen gegenüber besonders vulnerabel ist. Die Replikation des Genoms während der

S-Phase gehört sicherlich insbesondere zu den vulnerablen Zuständen einer Zelle, da nur fehlerfrei generierte Tochterzellen den Bestand des gesamten Organismus sichern können. Aus diesem Grund soll im Folgenden zunächst betrachtet werden, was in der bisherigen Literatur über die Rolle von p53 in der S-Phase bekannt ist.

Zusätzlich zu den in Kapitel 1.1.2.1 vorgestellten Checkpunkten des Zellzyklus am G1/S- sowie G2/M-Übergang, an denen p53 maßgeblich beteiligt ist, ist in der Literatur auch ein komplexer S-Phasen-Checkpunkt beschrieben, der sich aus drei unterschiedlichen Mechanismen zusammensetzt: einem Checkpunkt-Mechanismus zur Kontrolle störender Einflüsse innerhalb der Replikationsgabeln (Replikations-Checkpunkt), einem zweiten zur Verhinderung eines frühzeitigen Eintritts in die Mitose (S-M-Checkpunkt) sowie zuletzt einem dritten zur Reparatur von DNA-Schäden, insbesondere Doppelstrangbrüchen, die außerhalb der Replikons auftreten (Intra-S-Checkpunkt) (Bartek et al. 2004). Inwiefern p53 an einem dieser Checkpunkte beteiligt ist, ist in der Literatur allerdings umstritten. Die wissenschaftlichen Ergebnisse sind in ihrer Zusammenschau vage und konnten bisher keinen eindeutigen Mechanismus einer p53-Beteiligung hervorbringen (Bartek et al. 2004; Gottifredi und Prives 2005; Giono und Manfredi 2006). Einige Autoren argumentieren analog zum G1/S- und G2/M-Arrest für eine Checkpunkt-aufrechterhaltende Funktion von p53 (Montagnoli et al. 2004). Auf der Gegenseite steht das Argument, dass ein verlängerter Arrest während der Replikation zur erneuten Aktivierung bereits abgeschlossener Replikationsursprünge und somit zur Schädigung des Genoms durch Re-Replikation führen könnte (Bartek und Lukas 2001).

Eine andere Gruppe zeigte, dass p53 in der S-Phase transkriptionell inaktiv ist, wenn durch die Verwendung von Hydroxyurea die Replikation blockiert wird und sieht angesichts der während der DNA-Synthese auch physiologisch vorkommenden Doppelstrangbrüche und anderer „DNA-Schäden“ einen Vorteil in der vorübergehenden Inaktivierung der DNA-Schadensantwort durch p53 (Gottifredi et al. 2001).

Die Beschreibung einer neuen S-Phasen-spezifischen p53-Isoform namens Δp53 brachte eine weitere mögliche Rolle von p53 während der S-Phase ins Spiel: Diese Isoform wurde nach UV- oder Gamma-Bestrahlung exprimiert und aktivierte *p21* und *14-3-3σ*, nicht jedoch pro-apoptotische Zielgene, mit dem Ergebnis einer deutlich verzögerten S-Phase. Daher wurde ihr zugleich eine Rolle im Erhalt des S-Phasen-Checkpunktes zugeschrieben (Rohaly et al. 2005).

Etwas später jedoch konnte Δp53 als fehlgefaltetes, instabiles Protein ohne wesentliche Transaktivierungsfähigkeit charakterisiert werden (García-Alai et al. 2008).

Somit ist die Rolle des Tumorsuppressors p53 während der S-Phase weiterhin in großen Teilen unklar. Berichte über die transkriptionelle Inaktivität beschränken sich lediglich auf eine gestörte S-Phase, in der zur p53-Induktion genotoxische Einflüsse genutzt wurden, wodurch jedoch gleichzeitig auch eine DNA-Schadensantwort mit einer entsprechenden Modifikation von p53 ausgelöst wurde. Ein möglicher Hinweis auf eine präventive Funktion von p53 während der ungestörten Replikation ergibt sich dennoch aus der Betrachtung des S-Phasen-Checkpunktes: Viele der am Replikations-Checkpunkt beteiligten Mediatoren zeigen eine Aktivität sowohl in der Reaktion auf einen Schaden als auch eine Beteiligung an der regulären, ungestörten Replikation (Cha und Kleckner 2002; You et al. 2002; Mirzoeva und Petrini 2003; Lin et al. 2004; Shechter et al. 2004; Gottifredi und Prives 2005). Eine solche doppelte Funktion wäre auch für p53 denkbar.

1.5 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, über die Charakterisierung der Funktion des Tumorsuppressors p53 während der ungestörten S-Phase eine mögliche präventive Rolle im Sinne eines *ex-ante*-Modells zu evaluieren. Dazu musste zunächst ein Modell gefunden werden, in dem p53 ohne die gezielte Auslösung eines DNA-Schadens während der S-Phase stabilisiert werden kann.

Nach Synchronisation von Zellen in der S-Phase sollte über die Extraktion von RNA und deren Analyse mittels reverser Transkription und quantitativer Realtime-PCR die Induktion einzelner p53-responsiver Gene bestimmt werden, sowie über die Analyse mittels Western Blot auch die Induktion auf Proteinebene. Um einen umfassenden Überblick über die während der ungestörten S-Phase responsiven Gene zu erhalten, wurde zudem eine mRNA-Sequenzierung als Methode des *Next Generation Sequencing* als weiterer methodischer Ansatz gewählt.

Über die genauere Betrachtung des Ablaufs der S-Phase mittels High-Content-Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie sollten weiterhin Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung dieser vulnerablen Zellzyklusphase durch p53 gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Verwendetes Gerät	Hersteller
Bioanalyzer 2100	Agilent
Blotting Kammer	Biozym
Chemilumineszenz-Bildwandler Chemocam HR 16 3200	Intas Science Imaging Instruments
Cluster-Generator für Sequenzierung: cBot	Illumina
Eismaschine B100	Ziegra
Elektrophoresesystem für SDS-PAGE	Amersham Biosciences, GE Healthcare
FACS Canto II	BD Biosciences
FACS Gerät EasyCyte plus	Guava Technologies, Millipore
Folienschweißgerät Vacupack plus	Krups
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	Heraeus, Thermo Scientific
Heizblock	Grant Instruments
Inkubator für die eukaryotische Zellkultur Hera Cell 150	Heraeus, Thermo Scientific
Kühlschrank 4°C	Liebherr
Magnetrührer MR3001	Heidolph
Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss
Mikroskop BD Pathway 855	Becton Dickinson
Mini-Zentrifuge MCF-2360	LMS
Netzteil Powerback P25T	Biometra

Neubauer Zählkammer (Neubauer improved)	Brand
PCR-Maschine für qPCR CFX96, C1000	Bio-Rad Laboratories
PCR-Maschine Primus 25 advanced	Peqlab
pH-Meter WTW-720	WTW
Pipetten Research Series 2100 (0,1-2,5µl; 0,5-10µl; 10-100µl; 100-1000µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe, elektrisch, Portable-XP	Drummond
Roller RM5 V-30	CAT
Scanner CanoScan 8600F	Canon
Schüttler PROMAX 2020	Heidolph
Sequenzierungsgerät HiSeq 2000	Illumina
Spektrophotometer NanoDrop ND-1000	Peqlab
Sterilbank Hera Safe®	Heraeus, Thermo Scientific
Stickstofftank LS 4800	Taylor-Wharton
Vakuumpumpe Vacusafe Comfort	IBS Integra Biosciences
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage Acculab ALC-6100.1	Sartorius
Waage LE623S	Sartorius
Wärmeschrank UF 75	Memmert
Zentrifuge 5415R	Eppendorf
Zentrifuge 5810R	Eppendorf
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Thermo Scientific

2.1.2 Software

Tabelle 2: Software

Verwendete Software	Firma
Access (verschiedene Versionen)	Microsoft
Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
Atto Vision (BD Pathway)	Becton Dickinson
CFX Manager Software (qPCR)	Bio-Rad
Excel (verschiedene Versionen)	Microsoft
FACSDiva (Version 6.1.3)	BD Biosciences
GraphPad Prism (Version 5 und 6)	GraphPad Software, Inc.
Guava Express Software	Millipore, Merck
Intas ChemoStar Imager	Intas Science Imaging Instruments
NanoDrop Software	Peqlab
PowerPoint (verschiedene Versionen)	Microsoft
Word (verschiedene Versionen)	Microsoft
BaseCaller	Illumina
CASAVA (Version 1.8.2)	Illumina
FastQC (Version 0.10.1)	Babraham Bioinformatics
Tophat (Galaxy Version 0.9)	Bereitgestellt durch Center for Computational Biology der Johns Hopkins University, entwickelt von Cole Trapnell
HTSeq	Freie Software, unter GNU General Public License, publiziert von Free Software Foundation, entwickelt von Simon Anders
DESeq2 (Version 1.10.1)	entwickelt von Michael Love, Simon Anders, Wolfgang Huber

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
96-Well-Platten für Durchflusszytometrie	Becton Dickinson
96-Well-Platten für Mikroskopie, durchsichtiger Boden	Becton Dickinson
96-Well-Platten für qPCR, weiß	4titude
Cryo-Tubes Cryoline	Nunc, Thermo scienfitic
Filter, steril	Millipore, Merck
Filterspitzen (10µl)	Starlab
Filterspitzen (20µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt
Injektionskanülen (verschiedene Größen)	B.Braun
Injektionsspritzen	Henke-Sass
Parafilm	Brand
Pipettenspitzen (2µl, 10µl, 200µl, 1000µl)	Greiner
Protran Nitrozellulose Transfermembran	Whatman
Reaktionsgefäße (0,2ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15ml, 50ml)	Greiner
Versiegelungsfolie Aluminium für 96-Well-Platten	Becton Dickinson
Versiegelungsfolie transparent für 96-Well-Platten	4titude
Whatman-Papier	Whatman
Zellkulturplatten (6-Well)	Greiner
Zellkulturschalen, 10cm, 15cm	Greiner
Zellschaber (16 cm)	Sarstedt

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Bezugsfirma
Albumin Fraktion V (Bovines Serum Albumin, BSA)	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Ammoniumsulfat $(NH_4)_2SO_4$	Roth
Aprotinin (Trasylol)	AppliChem
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Butanol, tert.	Roth
Chloroform	Roth
Ciprofloxacin	Bayer
Deoxycholsäure	AppliChem
desoxy-Nukleosidtriphosphate (dNTPs)	Promega
Dimethylsulfoxid (DMSO) für die Zellkultur	AppliChem
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Pulver	Gibco, Life technologies
Essigsäure (CH_3COOH)	Roth
Ethanol 99,9% pro analysi (p. a.)	Merck
Ethanol 99.8%	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Fetal calf serum (FCS)	Gibco, Life technologies
Formaldehyd, 37%	Sigma-Aldrich
Glycerin	Roth
Glycin, >99%	Roth
Glyco Blue, 15 mg/ml	Ambion
Guava ICF Reinigungslösung	Millipore, Merck
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Roth

Hoechst 33342	Invitrogen, Life technologies
Immobilon Western HRP	Millipore
Isopropanol	Th. Geyer
Leupeptin Hemisulfat	AppliChem
L-Glutamin	Gibco, Life technologies
Magnesiumchlorid für PCR	Fermentas, Thermo Scientific
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth
Methanol >99%	Roth
Milchpulver, *blotting grade*	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdesoxycholat	AppliChem
Natriumlaurylsulfat (SDS) ultra pure, >99,5%	Roth
Nonamere, beliebig	Metabion
Oligo dT_{23} VN Primer	Metabion
Page Ruler Proteinleiter	Fermentas, Thermo Scientific
Pefabloc SC Proteaseinhibitor	Roth
Pepstatin A	AppliChem
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), 10x, pH 7,4	Invitrogen
Ponceau S	Roth
Propidiumiodid, 1mg/ml	Sigma-Aldrich
Rotiphorese Gel 30	Roth
Salzsäure (HCl)	Roth
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific
SYBR Green	Invitrogen, Life technologies
Tetracyclin	Gibco, Life technologies

Tetramethylethylendiamin (TEMED), p. a., 99%	Roth
Thymidin	Sigma-Aldrich
Trehalose	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (TRIS)	Roth
Triton X-100	AppliChem
TriZol	Ambion (life technologies)
Trypsin/ EDTA	Gibco, Life technologies
Tween-20	AppliChem
Urea, p. a., >99,5%	Roth
Wasser, Nuklease-frei	Promega

2.1.5 Enzyme und zugehörige Puffer

Tabelle 5: Enzyme und zugehörige Puffer

Verwendetes Enzym / Puffer	**Bezugsfirma**
M-MuLV Reverse Transkriptase (RT)	New England Biolabs
Puffer für M-MuLV RT, 10x	New England Biolabs
Puffer für Taq, 10x	Fermentas, Thermo Scientific
Ribonuklease (RNase) A, 100 mg/ml	Quiagen
RNase Inhibitor, rekombinant, 40 000 U/ml	New England Biolabs
Taq DNA-Polymerase	Fermentas, Thermo Scientific
Taq DNA-Polymerase für qPCR	Primetech

2.1.6 Kits

Tabelle 6: Kits

Verwendetes Kit	Hersteller
Click-iT EdU Alexa Fluor 488 HCS Assay Kit	Invitrogen (life technologies)
Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 647 Flow Cytometry Assay Kit	Life technologies
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
TruSeq RNA LT SamplePrep Kit	Illumina
QuantiFluor dsDNA System	Promega
Guava Check Kit	Millipore, Merck

2.1.7 Chemotherapeutika

Tabelle 7: Chemotherapeutika

Chemotherapeutikum	Hersteller
Gemcitabin (2',2'-difluorodeoxycytidine (dFdC))	Eli Lilly
Nutlin-3	Sigma-Aldrich

2.1.8 Oligonukleotide (Primer)

Tabelle 8: Oligonukleotide (Primer)

Primer	Sequenz
p21 *forward*	5'-TAG GCG GTT GAA TGA GAG G-3'
p21 *reverse*	5'-AAG TGG GGA GGA GGA AGT AG-3'
36B4 *forward*	5´-GAT TGG CTA CCC AAC TGT TG-3´
36B4 *reverse*	5´-CAG GGG CAG CAG CCA CAA A-3´
P53R2 *forward*	5'- GTA GCT GAC AGA TTA CTT GTG G -3'
P53R2 *reverse*	5'- CGC TGA TAC TCT GAA ACT CGT -3'
PCNA *forward*	5'- TGT CGA TAA AGG AAG C -3'

PCNA *reverse*	5'- CGT TGA AGA GGA GTG G -3'
14-3-3s *forward*	5'- CTG ATC CAG AAG GCC AAG CT -3'
14-3-3s *reverse*	5'- TCC ACG GCG CCT TTC A -3'
PUMA *forward*	5'- CTC AGG AAA GGC TGT TGT GCT -3'
PUMA *reverse*	5'- AGT GTC ACC CCT GCA GCT G -3'

Die hier aufgelisteten Primer wurden von der Firma Metabion international Aktiengesellschaft bezogen.

2.1.9 **Antikörper**

Tabelle 9: Primärantikörper

Primärantikörper				
Antigen	**Herkunftsorganismus des Antikörpers**	**Klon**	**Bezugsfirma**	**Verwendete Verdünnung**
Hsc70	Maus	B-6	Santa Cruz	1 : 15 000
p53	Maus	DO-1	Santa Cruz	1 : 1 000
p21 Waf1/Cip1	Kaninchen, monoklonal	12D1	Cell signalling	1 : 1 000
γH2AX	Kaninchen	20E3	Cell signalling	1 : 1 000
β-Aktin	Maus, monoklonal	AC-15	Abcam	1 : 20 000

Tabelle 10: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper		
Name des Antikörpers	**Bezugsfirma**	**Verwendete Verdünnung**
Peroxidase-conjugated F(ab')2 Fragment Donkey Anti-Mouse, IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	1 : 10 000
Peroxidase-conjugated F(ab')2 Fragment Donkey Anti-Rabbit, IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	1 : 10 000

2.1.10 **Zelllinie**

Tabelle 11: Zelllinie

Name der Zelllinie	**Charakterisierung**
U2OS	humane Osteosarkomzellen

2.1.11 **Medium für die Zellkultur**

Tabelle 12: Zusammensetzung DMEM ohne Zusatz

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), ohne Zusatz	
DMEM Pulver	10 g
$NaHCO_3$	3,7 g/l
HEPES	5,96 g/l
H_2O	ad 1 l

Tabelle 13: Zusammensetzung DMEM mit Zusatz

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Vollmedium mit Zusatz	
DMEM ohne Zusatz	90%
FCS	10%
Penicillin / Streptomycin	50 U/ml
Tetracyclin	2 µg/ml
L-Glutamin	200 µM
Ciprofloxacin	10 µg/ml

2.1.12 **Puffer und Lösungen**

Tabelle 14: Zusammensetzung PCR-Ansatz

10 x PCR-Mix	
TRIS-HCl (pH 8,8)	750 mM
Ammoniumsulfat	200 mM
Tween-20	0,1%
H_2O, autoklaviert	

Tabelle 15: Zusammensetzung PCR-Master-Mix

qPCR Master-Mix	
10 x PCR-Mix	1 x
$MgCl_2$ für PCR	3 mM
SYBR Green (1:800)	1 : 80 000
dNTPs	0,2 mM
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	20 U/ml
Triton X-100	0,25%
Trehalose in 10 mM TRIS (pH 8,0)	300 mM
H_2O, autoklaviert	ad 25 µl pro Probe

Tabelle 16: Zusammensetzung RIPA-Puffer

RIPA (*Radioimmunoprecipitation-assay*) -Puffer	
Triton X-100	1%
Deoxycholsäure	1%
SDS	0,1%
NaCl	150 mM
EDTA	10 mM
TRIS-HCl (pH 7,5)	20 mM
Trasylol	100 000 KIE

Tabelle 17: Zusammensetzung Lyse-Puffer für die Proteinextraktion

Lyse-Puffer für die Proteinextraktion	
RIPA-Puffer	80%
Urea (8M)	20%
Pefabloc	1 : 100
Pepstatin A	1 : 1000
Leupeptin / Aprotinin	1 : 1000

Tabelle 18: Zusammensetzung Laemmli-Puffer

6 x Laemmli-Puffer	
TRIS-HCl (pH 6,8)	0,35 M
Glycerin	30%
SDS	10%
DTT	9,3%
Bromphenolblau	0,02%

Tabelle 19: Zusammensetzung Western-Salts-Lösung

10 x Western Salts	
TRIS-HCl (pH 8,3)	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	0,02%
dH_2O	

Tabelle 20: Zusammensetzung TBS

10 x TBS (TRIS-gepufferte Salzlösung)	
TRIS-HCl (pH 7,5)	500 mM
NaCl	1,5 M

Tabelle 21: Zusammensetzung TBS-T

TBS-T	
TBS	1 x
Tween-20	0,1%

Tabelle 22: Zusammensetzung Blocking-Lösung für Western Blot

Blocking-Lösung für Western Blot	
TBS-T	
Magermilchpulver	5%

Tabelle 23: Zusammensetzung PBS

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung), pH 7,4	
NaCl	137 mM
KCl	2,5 mM
Na_2HPO_4	1,47 mM
$CaCl_2$	0,9 mM
$MgCl_2$	0,5 mM

Tabelle 24: Zusammensetzung SDS-Laufpuffer für Gelelektrophorese

SDS Laufpuffer für die Gelelektrophorese	
TRIS-Base	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,01%

Tabelle 25: Zusammensetzung Ponceau-S-Lösung

Ponceau-S-Lösung	
Ponceau S	0,5 g
Eisessig (reine Essigsäure)	1 ml
H_2O	ad 100 ml

Tabelle 26: Zusammensetzung Transfer-Puffer für Western Blot

Transfer-Puffer für Western Blot	
10 x Western Salts	1 x
Methanol	20%
ddH_2O	

Tabelle 27: Zusammensetzung Fixierungs-Lösung für EdU-Fluoreszenzmikroskopie

Fixierungs-Lösung für EdU-Fluoreszenzmikroskopie	
Formaldehyd	3,7%
in PBS	

Tabelle 28: Zusammensetzung Permeabilisierungs-Lösung für EdU-Fluoreszenzmikroskopie

Permeabilisierungs-Lösung für EdU- Fluoreszenzmikroskopie	
Triton X-100	0,5%
in PBS	

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von U2OS-Zellen

Zur Kultivierung dieser adhärenten Zelllinie wurden Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 15 cm verwendet. Die Inkubation erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 37°C, einem CO_2-Gehalt von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 95%, als Zellkulturmedium diente das in Tabelle 13 beschriebene DMEM mit Zusatzstoffen. Alle in diesem Abschnitt verwendeten Lösungen wurden direkt vor ihrer Anwendung auf 37°C erwärmt, um möglichen Stress der Zellen durch Temperaturunterschiede zu vermeiden.

2.2.1.2 Passagieren von U2OS-Zellen

Zum Passagieren der Zellen wurde zunächst das Zellkulturmedium mithilfe einer Absaugpumpe entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Dadurch wurden einerseits tote Zellen entfernt und andererseits Reste des Zellkulturmediums, dessen Bestandteil FCS Proteasen inaktiviert. Im Folgenden wurden 3 ml einer Lösung der Protease Trypsin mit zugesetztem EDTA hinzugefügt und die Zellkulturschale zur gleichmäßigen Verteilung des Trypsins leicht geschwenkt. Der Überstand wurde entfernt, sodass ein dünner Flüssigkeitsfilm auf den Zellen verblieb und diese für 3 Minuten zu den oben beschriebenen Bedingungen inkubiert. Das Trypsin sorgte in dieser Zeit für die Spaltung der Proteine, die den Zellen zur Haftung aneinander und am Untergrund dienen. Anschließend wurde mikroskopisch kontrolliert, ob sich die Zellen bereits vom Untergrund gelöst hatten und gegebenenfalls durch leichtes seitliches Klopfen eine weitere Ablösung unterstützt. Das Trypsin wurde sodann durch Zugabe einer geringen Menge Zellkulturmedium inaktiviert und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die

Zellen konnten nun in einer entsprechenden Verdünnung passagiert und in einer Zellkulturschale neu ausgesät oder gezählt und in gewünschter Anzahl auf eine Versuchsplatte ausgebracht werden.

2.2.1.3 Zählen von U2OS-Zellen

Zum Zählen der zuvor in Suspension gebrachten Zellen diente die Verwendung einer Neubauer-Zählkammer. In jede der zwei Hälften der Kammer wurden 10 µl der Zellsuspension eingebracht und unter dem Mikroskop jeweils vier Großquadrate ausgezählt. Für jede Hälfte wurde ein Mittelwert bestimmt und die Ergebnisse der beiden Hälften wiederum gemittelt. Dieser Wert wurde mit dem Faktor 10^4 multipliziert, um die Anzahl der Zellen in einem ml der Suspension zu erhalten.

2.2.1.4 Einfrieren von U2OS-Zellen

Um einen Vorrat der verwendeten Zellen zu lagern, wurden einige Aliquots niedriger Passage eingefroren. Dazu wurden Zellen wie unter 2.2.1.2 beschrieben suspendiert und anschließend in einem Falcon-Röhrchen für 10 min bei 900 rpm (*revolutions per minute*) und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einer eisgekühlten Lösung aus 90% FCS und 10% DMSO erneut suspendiert. Diese Suspension wurde anschließend auf mehrere Cryotubes verteilt. Um ein langsames Abkühlen von etwa -1°C pro Stunde zu erwirken, wurden die Cryotubes mit mehreren Schichten Zellstoff kälteisoliert und über Nacht bei -80°C gelagert, bevor sie am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff transferiert wurden.

2.2.1.5 Auftauen von U2OS-Zellen

Zum Auftauen der eingefrorenen Zellen wurde das Cryotube zunächst in der Hand erwärmt und die darin enthaltene Zellsuspension dann in vorgewärmtes Kulturmedium in einer Zellkulturschale überführt. Am ersten Tag nach dem Auftauen erfolgte ein Wechsel des Mediums, um einen Großteil des DMSO zu entfernen und die Belastung der Zellen gering zu halten. Die Zellen wurden anschließend mehrere Male passagiert, bevor sie für Experimente eingesetzt wurden.

2.2.1.6 Synchronisation kultivierter U2OS-Zellen mithilfe eines doppelten Thymidin-Blocks

Um U2OS-Zellen gezielt während der S-Phase untersuchen zu können, wurden diese in ihrem Zellzyklus synchronisiert. Eine bewährte Methode für diesen Zweck ist die Anwendung eines doppelten Thymidin-Blocks (Bootsma et al. 1964). Die Inkubation mit einem hohen Überschuss Thymidin führt über negative Feedback-Mechanismen zu einer Hemmung der Nukleotidsynthese, sodass die Zellen nahe der G1/S-Grenze in ihrem Zellzyklus angehalten werden (Bostock et al. 1971). Die einmalige Anwendung eines Thymidin-Blocks stoppt einen Großteil der Zellen an dieser Grenze. Jedoch werden die Zellen, die sich zu Beginn der Applikation des Thymidins gerade in der S-Phase befinden, zu verschieden weit fortgeschrittenen Zeitpunkten der Replikation angehalten und somit nicht nahe der G1/S-Grenze synchronisiert. Aus diesem Grund erfolgt eine Aufhebung des ersten Blocks für 8 h, in denen allen Zellen Gelegenheit gegeben wird, die begonnene S-Phase zu durchlaufen. Keine der Zellen wird jedoch in der Lage sein, in dieser Zeit in eine zweite S-Phase einzutreten. Bei Applikation des zweiten Thymidin-Blocks befindet sich demnach die überwiegende Mehrheit der Zellen in einer anderen Phase des Zellzyklus als der S-Phase. Auf diese Weise wird nun die größtmögliche Anzahl der Zellen nahe der G1/S-Grenze synchronisiert und kann nach Aufhebung des Blocks synchron die anschließende S-Phase durchlaufen.

In den durchgeführten Versuchen wurde eine Thymidin-Konzentration von 2 mM in Zellkulturmedium verwendet. Die Dauer eines Thymidin-Blocks betrug je nach Experiment entweder 16 oder 17 h, um ein zeitoptimiertes Protokoll zu erhalten. Zwischen den beiden Thymidin-Blöcken wurde stets für 8 h in normalem Zellkulturmedium inkubiert. Zur Aufhebung eines Blocks wurden Zellen, die in 6-Well-Platten kultiviert wurden, viermal mit 37 °C warmem PBS gewaschen. Bei der Kultivierung in 96-Well-Platten, die zur Fluoreszenzmikroskopie verwendet wurden, musste vorsichtiger vorgegangen werden. Hier erfolgte die Aufhebung eines Thymidin-Blocks durch dreimaliges Waschen mit 37°C warmem Zellkulturmedium, das in jedem Waschschritt für etwa fünf Minuten auf den Zellen belassen wurde.

2.2.1.7 Inkubation kultivierter U2OS-Zellen mit Nutlin-3

Die Inkubation kultivierter U2OS-Zellen mit Nutlin-3 diente der Akkumulation von freiem und aktivem p53. In einer Zelle wird zu jeder Zeit p53 synthetisiert und unter normalen Bedingungen durch eine Feedback-Schleife von MDM2 negativ reguliert. Nutlin-3 gehört

zur Gruppe der Nutline, bei denen es sich um sogenannte „small molecules“, also kleine Moleküle handelt, die meist eine sehr gezielte Funktion wahrnehmen. Nutline binden spezifisch in die p53-Bindungstasche des Proteins MDM2. Durch den Einsatz von Nutlin-3 wird die Bindungstasche blockiert und eine Interaktion zwischen MDM2 und p53 unterbunden. Somit kommt es zu einer Unterbrechung der negativen Regulation und einer verminderten Degradation von p53, dessen Konzentration in der Zelle nachfolgend ansteigt. Dieser Wirkmechanismus beruht also nicht auf einer Aktivierung von p53 im Rahmen einer „DNA damage response“ (Vassilev 2004). In den durchgeführten Experimenten wurde eine Dosierung von 10 µM verwendet. Nutlin-3 ist in DMSO gelöst, weshalb in allen Experimenten zudem Negativkontrollen mit DMSO eingesetzt wurden. Die Inkubationsdauer variierte je nach verwendetem Protokoll zwischen 4 und 14 h.

2.2.1.8 Inkubation kultivierter U2OS-Zellen mit Gemcitabin

Gemcitabin (2',2'-difluorodeoxycytidine) ist ein Chemotherapeutikum aus der Gruppe der Pyrimidinanaloga, das in der Zelle durch Phosphorylierung aktiviert wird. Seine Wirkung übt es über einen Abbruch der DNA-Replikation sowie über eine Hemmung der Nucleotidsynthese aus (Plunkett et al. 1995). Der dadurch ausgelöste replikative Stress induziert unter anderem die Akkumulation von p53 im Rahmen einer DNA-Schadensantwort.

Zur Inkubation von U2OS-Zellen wurde in Wasser gelöstes Gemcitabin in einer Konzentration von 100 nM verwendet. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nicht behandelt wurden. Die Inkubation erfolgte in den durchgeführten Experimenten für jeweils vier Stunden.

2.2.2 **Molekularbiologische Methoden unter Verwendung von RNA**

2.2.2.1 Isolierung von RNA aus U2OS-Zellen

Um RNA aus kultivierten U2OS-Zellen zu isolieren, wurde das TRIzol Reagenz verwendet. Dieses enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat. Zunächst wurde das Zellkulturmedium mithilfe einer Vakuumpumpe entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen in 1 ml TRIzol pro Well einer 6-Well-Platte. Durch das enthaltene Guanidinthioisocyanat werden zudem Proteine denaturiert, was zu einer Inaktivierung von RNasen führt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raum-

temperatur wurde das Zelllysat durch Auf- und Abpipettieren gemischt und anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt. An dieser Stelle konnte das Protokoll unterbrochen und das Lysat bei -20°C über Nacht gelagert werden.

Durch Hinzufügen von 200 µl Chloroform pro 1 ml TRIzol erfolgte im nächsten Schritt die Auftrennung von Proteinen, DNA und RNA in verschiedenen Phasen. Nach dem Hinzufügen des Chloroforms wurden die Reaktionsgefäße für etwa 15 Sekunden kräftig geschüttelt und anschließend für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation mit 12.000 g bei 4°C für 30 Minuten erfolgte die Phasentrennung. In der unteren, phenolhaltigen Phase waren Proteine und Lipide gelöst, in der Interphase DNA. Die obere, wässrige Phase enthielt die zu isolierende RNA. Diese wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß transferiert.

Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol wurden die Reaktionsgefäße erneut für 15 Sekunden kräftig geschüttelt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation mit 12 000 g bei 4°C für 60 Minuten setzte sich die präzipitierte RNA als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes ab. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet in 1 ml 75% Ethanol vorsichtig gewaschen. Nach Zentrifugation mit 7.500 g bei 4°C für 5 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet ein zweites Mal in 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde mit 7.500 g bei 4°C für 10 min zentrifugiert und im Anschluss der Überstand verworfen. Das Pellet wurde nun für einige Zeit luftgetrocknet, danach in 30 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert und für 3 min bei 55°C inkubiert.

2.2.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit

Im Anschluss an die Isolierung der RNA aus U2OS-Zellen wurden die Konzentration und die Reinheit bestimmt. Dies ist durch die Verwendung des Photospektrometers NanoDrop möglich, mit dem Messungen der optischen Dichte erfolgen. Zur Konzentrations-bestimmung wird die Absorption ultravioletten Lichts einer Wellenlänge von 260 nm durch die Probe gemessen. Um eine Aussage über die Reinheit der RNA-Probe treffen zu können, wird der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm gebildet. Dieser sollte für RNA über 2 liegen. Zudem sollte der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und bei 230 nm über 2 liegen.

2.2.2.3 Aufreinigung isolierter RNA

Im Fall einer nicht ausreichenden Reinheit der isolierten RNA wurde diese noch einmal aufgereinigt. Dazu wurde eine weitere Alkohol-Präzipitation durchgeführt. Problematisch ist bei einer weiteren Aufreinigung allerdings, dass mit jeder vorgenommenen Fällungsreaktion auch Nukleinsäuren verloren gehen. War eine solche dennoch notwendig, wurde die isolierte RNA zunächst mit 1 µl GlycoBlue, 1/10 Volumenanteilen Natriumacetat mit einem pH von 5,2 sowie 2,5 Volumenanteilen reinem Ethanol versetzt. Durch die Verwendung von Natriumacetat wird die Löslichkeit der Nukleinsäure herabgesetzt und die Präzipitation erleichtert. GlycoBlue ist ein Glykogen-haltiges Co-Präzipitans, das besonders für die Fällung geringer Mengen Nukleinsäure hilfreich ist. Zudem enthält es einen Farbstoff, der das Präzipitat besser sichtbar macht. Nach kurzem Vortexen erfolgte eine Zentrifugation mit 14.000 rpm für 15 min bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen. Dieses wurde mit 14.000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur erneut herunter-zentrifugiert und der Überstand wie zuvor verworfen. Das Pellet wurde luftgetrocknet und zuletzt in 30 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert.

2.2.2.4 Reverse Transkription von mRNA

Ziel der reversen Transkription ist die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus RNA. Dabei macht man sich die Funktion des Enzyms reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, zunutze, das beispielsweise in Retroviren vorkommt. In diesem Fall, zur Untersuchung der Induktion bestimmter p53-responsiver Gene, interessierte die in der Zelle vorliegende *messenger*-RNA (mRNA) als frühe Stufe der Genexpression auf dem Weg zum Protein. Um mit einer reversen Transkription gezielt die mRNA eines isolierten RNA-Gemischs in cDNA umzuschreiben, benutzt man unter anderem Oligo-dT-Primer, die an den für mRNA typischen Poly(A)-Schwanz binden. Des Weiteren werden Nonamere mit randomisierter Sequenz als Primer eingesetzt, um der Vielfalt der mRNA-Moleküle zu begegnen. Die reverse Transkription wurde wie folgt und unter Verwendung der in Tabelle 29 sowie Tabelle 30 beschriebenen Reaktionsansätze durchgeführt.

Tabelle 29: Zusammensetzung Reaktionsansatz I zur Durchführung einer reversen Transkription

Reaktionsansatz I, pro Probe	
isolierte RNA	1 µg in 5 µl
gemischte Primer (15 µM Nonamere, 50 µM $dT_{23}VN$ Primer)	2 µl
dNTPs (20 mM)	0,5 µl
H_2O, autoklaviert	ad 16 µl

Dieser Reaktionsansatz I wurde bei 70°C für 5 min inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

Tabelle 30: Zusammensetzung Reaktionsansatz II zur Durchführung einer reversen Transkription

Reaktionsansatz II, pro Probe	
RT 10 x Reaktionspuffer	2 µl
RNase-Inhibitor (10 U)	0,25 µl
M-MuLV Reverse Transkriptase (25 U)	0,125 µl
H_2O, autoklaviert	ad 4 µl

Pro Probe wurden 4 µl des Reaktionsansatzes II dem Ansatz I hinzugefügt. Zudem wurde für jede Probe eine Negativkontrolle ohne reverse Transkriptase angesetzt. In diesen Negativkontrollen fand in der anschließenden Reaktion keine reverse Transkription statt, es lag somit keine cDNA vor. Tabelle 31 zeigt das verwendete Protokoll.

Tabelle 31: Protokoll der reversen Transkription

Temperatur	**Zeitdauer**
42°C	1 h
95°C	5 min
10°C	∞

Im Anschluss an die reverse Transkription wurde jede Probe mit 30 µl autoklaviertem H_2O auf 50 µl Gesamtvolumen verdünnt. Die cDNA und die Negativkontrollen wurden bei -20°C gelagert.

2.2.2.5 Durchführung einer quantitativen Realtime-PCR

Die quantitative Realtime-PCR (qPCR) dient der Quantifizierung definierter DNA-Abschnitte in einer vorhandenen Probe. In der vorliegenden Arbeit handelte es sich dabei um cDNA, die mittels der vorangegangenen reversen Transkription von mRNA synthetisiert wurde. Durch diese Kombination der beiden Methoden kann also über cDNA als Maß für die in einer Zelle vorhandene mRNA die Genexpression zu einem bestimmten Zeitpunkt quantifiziert werden. Diese kombinierte Anwendung wird auch als qRT-PCR bezeichnet.

Das Prinzip der quantitativen PCR beruht auf der Durchführung mehrerer PCR-Zyklen, während derer sich der zu quantifizierende DNA-Abschnitt zunächst jeweils verdoppelt. Dem Ansatz ist zudem der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zugesetzt. Dieser bindet doppelsträngige DNA und emittiert in diesem Komplex grünes Licht (λ_{max} 520 nm) bei Anregung mit blauem Licht (λ_{max} 497 nm). Nach jedem der durchgeführten PCR-Zyklen wird die Emission des grünen Lichts gemessen. Um nun die in den verschiedenen Proben vorhandene Ziel-DNA quantifizieren zu können, wird bestimmt, nach welcher Anzahl von durchgeführten PCR-Zyklen (*cycles*) die Lichtemission eine gesetzte Grenze (*threshold*) überschreitet. Dieser Wert wird C_t-Wert genannt und erlaubt einen Vergleich der Proben miteinander. Die vorhandene DNA wird jedoch nur zu Beginn der Durchführung mit jedem PCR-Zyklus verdoppelt. Mit zunehmender Anzahl der PCR-Produkte erfolgt auch eine zunehmende Sättigung der Polymerase und der exponentielle geht in einen linearen Anstieg über, bis schließlich eine komplette Sättigung erreicht ist. Aus diesem Grund muss der *threshold* zur Bestimmung des C_t-Wertes innerhalb des exponentiellen Bereichs des Anstiegs liegen, da nur während dieser Phase eine direkte Korrelation zwischen gemessener Fluoreszenz und DNA-Menge besteht.

Die Durchführung der qPCR erfolgte unter Anwendung des in Tabelle 32 dargestellten Reaktionsansatzes wie nachfolgend beschrieben.

Tabelle 32: Zusammensetzung Reaktionsansatz qPCR

Reaktionsansatz qPCR, pro Probe	
qPCR Master-Mix (siehe Tabelle 15)	14 µl
Primer forward (100 µM)	0,075 µl
Primer reverse (100 µM)	0,075 µl
H_2O, autoklaviert	ad 23 µl

Dieser Ansatz wurde für die jeweiligen Gene mit entsprechenden Primern als Master-Mix vorbereitet und in der PCR-Platte vorgelegt. Jeweils 2 µl der zu untersuchenden cDNA wurden anschließend zugefügt. Für jede Probe wurden Triplikate angelegt sowie die in 2.2.2.4 beschriebene Negativkontrolle aus reverser Transkription ohne reverse Transkriptase verwendet, um eventuelle Verunreinigungen der Probe mit DNA auszuschließen. Zudem wurde für jedes Gen eine Kontrolle mit Wasser anstatt cDNA durchgeführt, um auch den verwendeten Master-Mix auf Verunreinigungen mit DNA zu untersuchen. Vor dem Beginn der qPCR wurden die Proben in den PCR-Platten noch einmal kurz und mit einer geringen Umdrehungszahl herunterzentrifugiert. Tabelle 33 zeigt das verwendete q-PCR-Protokoll.

Tabelle 33: Einzelne Schritte der qPCR

qPCR-Protokoll		
1:	95°C	2 min
2:	95°C	15 sec
3:	60°C	1 min
4:	Emissionsmessung	
Die Schritte 2, 3 und 4 wurden 40-mal wiederholt.		

2.2.2.6 Auswertung einer quantitativen Realtime-PCR

Die Auswertung einer qPCR erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurde wie bereits erwähnt ein geeigneter *threshold* während des exponentiellen Anstiegs der Fluoreszenz festgelegt. Ein wichtiger Störfaktor für die Auswertung und Interpretation einer qPCR sind sogenannte *primer-dimers*, bei denen es sich um kurze Amplifikate dimerisierter Primer handelt. Diese zeigen aufgrund ihrer geringen Länge jedoch einen niedrigeren Schmelzpunkt als das gewünschte Amplifikat der zu untersuchenden cDNA, das üblicherweise etwa 100 bp lang ist. Um eine Verfälschung des Ergebnisses durch *primer-dimers* oder andere aberrante PCR-Produkte auszuschließen, wurde in einem zweiten Schritt der Auswertung der Schmelzpunkt der Amplifikate einer jeden Probe betrachtet. Da für ein eingesetztes Primerpaar bekannt ist, welche Schmelztemperatur sein zugehöriges PCR-Produkt besitzt, wurden nur Proben mit den entsprechenden Schmelzpunkten berücksichtigt.

Ein wichtiger Schritt für die Auswertung der qPCR ist die Normalisierung der gemessenen C_t-Werte auf die eines Referenzgens, das auch als *housekeeping-* oder Haushalts-Gen

bezeichnet und in seiner Expression nicht vom vorgenommenen Experiment beeinflusst wird. Ein solches Gen ist *36B4*, auch *RPLP0* genannt. Es codiert für ein ribosomales Protein, das einen Teil der 60S-Untereinheit bildet. Durch die Normalisierung werden gemessene Unterschiede der C_t-Werte ausgeglichen, die beispielsweise auf einer unterschiedlichen Menge initial eingesetzter cDNA in den einzelnen Proben beruhen. Aus diesem Grund erfolgte für jede Probe einer durchgeführten qPCR auch die Quantifizierung dieses Haushaltsgens. Die Normalisierung wurde entsprechend der folgenden Formel durchgeführt:

$$\text{normalisierter Expressionswert} = 2^{-(C_{t(\text{Zielgen})} - C_{t(36B4)})}$$

Abbildung 1: Normalisierung der qPCR-Daten auf das Haushaltsgen *36B4*

Die mit dieser Formel errechneten normalisierten Expressionswerte konnten nun verglichen werden und waren einer Berechnung der statistischen Kennwerte zugänglich. Die Darstellung der Signifikanz erfolgte nach folgendem Schema: nicht signifikant (n.s.) bei $p > 0{,}05$, * bei $p \leq 0{,}05$, ** bei $p \leq 0{,}01$, *** bei $p \leq 0{,}001$ sowie **** bei $p \leq 0{,}0001$. In der graphischen Ergebnisdarstellung wurde bewusst auf die Verhältnisbildung von Behandlung und Kontrolle verzichtet, um die Genexpression differenziert voneinander betrachten zu können, da sich in den durchgeführten Experimenten regelmäßig mit dem Zellzyklus zusammenhängende unterschiedliche Expressionslevel auch in den Kontrollen zeigten. Die Betrachtung nur des Verhältnisses aus Kontrolle und Behandlungsgruppe hätte die Art der Verhältnisänderung verschleiert.

2.2.2.7 Analyse der Genexpression von U2OS-Zellen mittels RNA-Sequenzierung

Die RNA-Sequenzierung ist eine Methode aus der Gruppe des „*Next Generation Sequencing*“, also einer neuen Generation von hoch leistungsfähigen Sequenzierungsverfahren, um eine große Datenmenge zu erheben. In einer Zelle sind je nach ihrer individuellen Differenzierung und dem aktuellen Status der Zelle unterschiedliche Gene aktiv. Diese Aktivität der verschiedenen Gene spiegelt sich in ihrer unterschiedlich starken Expression wider und somit im Vorhandensein höherer oder niedrigerer Mengen an dazugehöriger mRNA. Durch die Sequenzierung und Quantifizierung der gesamten mRNA einer Zelle ist es also möglich, auf die Aktivität der Genexpression dieser Zelle zu schließen und somit einen

umfassenden Überblick zu erhalten, wie sich einzelne im Experiment herbeigeführte Veränderungen auf die gesamte Genexpression der Zelle auswirken. Eine solche Analyse wird auch Transkriptom-Analyse genannt.

Da in einer Zelle die Menge an ribosomaler RNA im Verhältnis zur relevanten messenger-RNA deutlich überwiegt, beinhaltet die Vorbereitung der Proben die Entfernung ribosomaler RNA. In der weiteren Vorbereitung wird die mRNA weiter aufgereinigt und fragmentiert. Schließlich wird in einer reversen Transkription eine Bibliothek aus doppelsträngiger cDNA gewonnen, die sich aufgrund ihrer Stabilität gegenüber störenden Einflüssen wesentlich besser zur Weiterverarbeitung eignet als die sehr empfindliche einzelsträngige RNA.

Im Rahmen der hier verwendeten Sequenzierungsmethode der Firma Illumina werden die DNA-Fragmente denaturiert und an beiden Enden mit Adaptern versehen, welche die Bindung an die Oberfläche der Analyse-Kammer vermitteln. Dort erfolgt eine hochgradige Amplifikation der gebundenen Einzelstrang-DNA-Fragmente, sodass sich sogenannte Cluster aus identischen Fragmenten bilden. Durch Zugabe von Primern, Polymerase und fluoreszenzmarkierten Nukleotiden erfolgt die Sequenzierung während der Synthese des jeweils komplementären DNA-Stranges. Jedes fluoreszenzmarkierte Nukleotid ist dabei mit einem reversiblen Terminator der Synthese versehen, sodass diese nach dem Einbau eines jeden Nukleotids zunächst zum Stehen kommt. So kann durch Fluoreszenz-Detektion nach jeder Kettenverlängerung zuerst das neu eingebaute Nukleotid analysiert und dann der Terminator entfernt werden, um den Einbau des nächsten Nukleotids zu ermöglichen. Durch die vorliegenden Cluster verstärkt sich das Fluoreszenzsignal, sodass eine einfachere und genaue Detektion möglich ist.

Zur Durchführung der beschriebenen Sequenzierung wurden zunächst U2OS-Zellen in Zellkulturschalen kultiviert (2.2.1.1) und nach Protokoll behandelt. Anschließend wurde entsprechend Kap. 2.2.2.1 RNA isoliert, ihre Konzentration und Reinheit bestimmt und gegebenenfalls noch weitergehend aufgereinigt.

Die weitere Vorbereitung der RNA-Proben zur Erstellung von Bibliotheken sowie die Sequenzierung wurden durch das Transkriptom-Analyse-Labor (TAL) der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Qualität der RNA-Proben mittels des Bioanalyzer 2100 von Agilent geprüft, wobei alle untersuchten Proben eine RNA-Integritätszahl von > 8 aufwiesen. Ausgehend von 1.000 ng RNA erfolgte die Vorbereitung der Bibliotheken-Erstellung unter Verwendung des TruSeq RNA LT SamplePrep Kits von Illumina. Zur Quantifizierung der cDNA-Bibliotheken wurde das QuantiFluor dsDNA System (Promega) verwendet und deren Größenspanne mittels des

DNA 1000 Chips des Bioanalyzer 2100 analysiert (290-310 Basenpaare). Die Amplifizierung und Sequenzierung der cDNA-Bibliotheken erfolgte durch die Geräte cBot und HiSeq 2000 der Firma Illumina. Die Sequenzierungs-Aufnahmen wurden durch die Software BaseCaller (Illumina) in bcl-Dateien umgewandelt und diese anschließend über die CASAVA-Software (Version 1.8.2) in fastq-Dateien entschachtelt.
Die Analyse und graphische Darstellung der so erhaltenen Daten wurde durch Magdalena Wienken vorgenommen. Es erfolgte der Abgleich der Dateien mit dem humanen Referenzgenom (UCSC hg19) durch Anwendung des Programms TopHat (Galaxy Version 0.9) (Kim et al. 2013). Registrierungen jeder Probe und jedes Gens wurden mittels htseq-count zusammengefasst (Anders et al. 2015), die differenzielle Expression über das Programm DESeq2 in der Version 1.10.1 bestimmt (Love et al. 2014).

2.2.3 **Molekularbiologische Methoden unter Verwendung von Proteinen**

2.2.3.1 Ernten von Proteinen durch Herstellung eines Zelllysats

Um die Proteine der in 6-Well-Platten inkubierten U2OS-Zellen analysieren zu können, wurden die Zellen lysiert. Nach Entfernen des Zellkulturmediums und Waschen der Zellen mit PBS wurden zu diesem Zweck pro Well 150 µl eines RIPA-Lyse-Puffers eingesetzt (siehe Tabelle 16). Mit Hilfe eines Zellschabers konnten die Zellen vom Untergrund gelöst werden. Das entstandene Lysat wurde in ein Reaktionsgefäß transferiert und gründlich durchmischt.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration eines Lysats mittels BCA-Test

Der BCA-Test ist eine Methode zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration einer vorhandenen Probe. Der Test beruht darauf, dass zunächst zweiwertige Kupferionen durch die in einer Lösung enthaltenen Proteine zu einwertigen Ionen reduziert werden (Biuret-Reaktion). Diese wiederum bilden mit Bicinchoninsäure (engl. *bicinchoninic acid*, BCA) einen violetten Farbkomplex, der Licht der Wellenlänge 562 nm absorbiert. Da diese Reaktion quantitativ abläuft, erlaubt die Absorptionsmessung der Lösung durch den Vergleich mit einer gemessenen Standard-Verdünnungsreihe eine Aussage über die in der Probe enthaltene Proteinkonzentration.

Zur Vorbereitung des Tests wurden die Proben bei 4°C zuerst 15 min lang mit einer Frequenz von 1000/min geschüttelt und danach mit 10.000 rpm für 10 min zentrifugiert, um störende größere Bestandteile des Zelllysats abzusetzen. Zur Durchführung des Tests wurde ein entsprechendes Kit nach Anleitung verwendet (siehe Tabelle 6). Die photometrische Messung erfolgte mit dem Photospektrometer NanoDrop jeweils in Triplikaten.

2.2.3.3 Adjustieren der Proteinkonzentration für eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Durchführung einer Western-Blot-Analyse sollten in jedem Ansatz gleiche Proteinkonzentrationen eingesetzt werden, damit ein Vergleich der detektierten Zielproteine zwischen den verschiedenen Proben in einem Gel möglich ist. Daher wurden alle Proben eines Ansatzes auf die geringste gemessene Proteinkonzentration zu einem Gesamtvolumen von 45 µl herunterverdünnt. Zur Verdünnung diente in diesem Fall RIPA-Puffer.

2.2.3.4 Auftrennen eines Proteingemischs mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Durchführung einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung eines Proteingemischs nach der molekularen Masse. Das verwendete Polyacrylamidgel besitzt eine maschenartige Struktur, in der die auf einer Seite des Gels in Taschen eingebrachten negativ geladenenen und linearisierten Proteine durch das Anlegen einer Spannung zur Anode wandern. Aufgrund ihrer Größe werden Proteine großer molekularer Masse stärker in den Maschen des Gels zurückgehalten, während kleine Proteine schneller wandern. Bei der Anwendung einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese wird das Proteingemisch zunächst der Bezeichnung entsprechend in einem Sammelgel gesammelt und dann in einem Trenngel der Größe nach aufgetrennt.

Zunächst müssen die Proteine zu diesem Zweck vorbereitet werden, dazu wurde 10 µl 6 x Laemmli-Puffer zu jeder Probe gegeben. Dieser enthält unter anderem das Detergens SDS, das Proteine aufgrund der Spaltung von Wasserstoffbrückenbindungen denaturiert. Zudem bindet das SDS an die denaturierten Proteine, lädt diese gleichmäßig negativ und überdeckt somit auch deren Eigenladungen. Ein weiterer Bestandteil des Laemmli-Puffers ist das Thiol DTT, welches aufgrund seiner reduzierenden Eigenschaft Disulfidbrücken der Proteine spalten kann und damit zur Denaturierung beiträgt. Um das Voranschreiten des aufgetragenen Gemischs im Gel beobachten und die Elektrophorese vor dem Auslaufen

der Proben auf der anderen Seite des Gels beenden zu können, ist dem Puffer zudem der kleine anionische Farbstoff Bromophenolblau zugesetzt, der etwas schneller wandert als die Proteine und somit eine optische Kontrolle über das Voranschreiten der Elektrophorese erlaubt.

Die Gele wurden mit der folgenden Zusammensetzung gegossen.

Tabelle 34: Zusammensetzung Trenngel für SDS-PAGE

Trenngel, 12% Acrylamid	
dH_2O	2,9 ml
Acrylamid (30%)	3,9 ml
Tris, 1,5 M, pH 8,8	2,4 ml
SDS (10%)	93, 75 µl
APS (10%)	62,5 µl
TEMED	7,5 µl

Tabelle 35: Zusammensetzung Sammelgel für SDS-PAGE

Sammelgel, 5% Acrylamid	
dH_2O	3,4 ml
Acrylamid (30%)	850 µl
Tris, 1 M, pH 6,8	625 µl
SDS (10%)	50 µl
APS (10%)	50 µl
TEMED	10 µl

Es wurde ein SDS-Laufpuffer verwendet (siehe Tabelle 24).

Die Proben wurden zunächst bei 95°C für 5 min erhitzt und anschließend für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. 5 µl des Größenmarkers Page Ruler wurden zudem mit 15 µl Laemmli-Puffer versetzt und in eine Gel-Tasche am rechten oder linken Rand des Gels eingebracht.

Je nach gegossenem Gel wurde dieses sodann mit insgesamt 9 oder 14 Proben beladen, die bei 80 V in das Sammelgel liefen. Für die Auftrennung der Proteine im Trenngel wurde eine Spannung von 100 V angelegt.

2.2.3.5 Analyse aufgetrennter Proteine mittels Western Blot

Mithilfe eines Western Blots werden zuvor in einer SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennte Proteine irreversibel auf eine Membran übertragen und auf dieser mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht. Somit ist der gezielte Nachweis einzelner Proteine eines Zelllysats möglich, ohne dieses aufreinigen zu müssen.
Für die vorliegende Arbeit wurde die Variante des *Wet Blots* gewählt. Dabei wurde zur Übertragung der Proteine aus dem Acrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran folgende Anordnung in Transfer-Puffer (siehe Tabelle 26) unter Vermeidung von Lufteinschlüssen zusammengesetzt und in eine Blotting-Kammer eingespannt:

Anode

zwei Schwämme

drei Blätter Whatman-Papier

Nitrozellulose-Membran

Acrylamidgel

drei Blätter Whatman-Papier

ein Schwamm

Kathode

Bei 4°C erfolgte bei einer Spannung von 80 V für 2 h der Proteintransfer.
Zur Kontrolle eines gelungenen Transfers wurde die Membran anschließend mit Ponceau-S-Lösung gefärbt und die Proteinbanden sichtbar gemacht; gegebenenfalls wurde die Membran zu diesem Zeitpunkt geschnitten. Mit TBS-T wurde diese anschließend wieder entfärbt.
Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurde die Membran im Folgenden für 30 min bei Raumtemperatur mit einer Blocking-Lösung aus TBS-T und 5% Magermilch abgesättigt. Die Inkubation mit einem spezifischen Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen und für 15 min in Blocking-Lösung abgesättigt. Diese Abfolge wurde mehrfach wiederholt.
Für eine Stunde wurde sodann der Zweitantikörper inkubiert und danach die Membran nach dem genannten Schema mit TBS-T gewaschen und in Blocking-Lösung abgesättigt.
Zur Detektion der Antikörperbindung an das gesuchte Protein wurde die Membran nach Anleitung mit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate oder Immobilon

Western HRP (*horseradish peroxidase*) inkubiert und anschließend in Folie eingeschweißt. Das Signal wurde in einem Chemilumineszenz-Bildwandler erfasst. Je nach Versuch und Protein waren unterschiedliche Expositionszeiten notwendig.

2.2.4 Analyse der Replikationstätigkeit von U2OS-Zellen mittels EdU-Inkorporation und Detektion in der High-Content-Fluoreszenzmikroskopie

2.2.4.1 Markierung neu synthetisierter DNA mittels Inkorporation von EdU

Zur Analyse der Replikationstätigkeit einzelner Zellen diente die Verwendung des Click-iT EdU Alexa Fluor 488 HCS Assay Kits für die High-Content-Mikroskopie. Dazu wurden zunächst innerhalb des jeweiligen Experimentes U2OS-Zellen in speziellen, für die Fluoreszenzmikroskopie geeigneten 96-Well-Platten kultiviert und entsprechend des jeweiligen Protokolls behandelt. Um die Replikationstätigkeit der einzelnen Zellen zu erfassen, wurde für eine Zeitdauer von 2 h mit dem Thymidin-Analogon EdU in einer Gesamtkonzentration von 10 µM inkubiert, sodass dieses im Rahmen der Replikation in die neu synthetisierte DNA inkorporiert wurde. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mittels 20-minütiger Inkubation in 3,7%-Formaldehydlösung. Mit 0,5% Triton-X-100-Lösung wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS daraufhin für 15 Minuten permeabilisiert, um die Anwendung des Kits zu ermöglichen. Das Click-iT-Reagenz wurde nun nach Anleitung vorbereitet und die Zellen erneut zweimalig mit PBS gewaschen. Unter Lichtausschluss und kontinuierlicher Schwenkbewegung auf einem Schwenkgerät erfolgte die Click-Reaktion während der laut Anleitung vorgeschriebenen 30-minütigen Inkubationszeit mit dem Click-iT-Reagenz. Die Reaktion beruht auf der Kupfersulfat-katalysierten Kopplung des Farbstoffs Alexa Fluor 488 an das inkorporierte EdU. Nach zweimaligem Waschen der Zellen in PBS erfolgte zuletzt die Markierung der Zellkerne mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 für 45 Minuten; nach zweimaligem Waschen in PBS und Anbringen einer abdichtenden Folie auf den 96-Well-Platten konnten die Proben nun bis zur weiteren Analyse mittels BD Pathway Mikroskop lichtgeschützt und bei 4°C gelagert werden.

2.2.4.2 Darstellung und Analyse der Replikationstätigkeit einzelner Zellen durch die High-Content-Fluoreszenzmikroskopie

Zur Darstellung und Analyse der Replikationstätigkeit von U2OS-Zellen im Zeitraum der EdU-Inkubation wurde das BD-Pathway-Mikroskop verwendet. Für den Fluoreszenz-

farbstoff Alexa Fluor 488, der zuvor in einer Click-Reaktion an das Thymidin-Analogon EdU gekoppelt wurde und der Darstellung neu synthetisierter DNA dient, wurde ein Exzitationsmaximum von 495 nm gewählt. Für den Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342, der an die gesamte DNA einer Zelle bindet und somit der Darstellung aller Zellkerne dient, betrug das angewendete Exzitationsspektum 460-490 nm. Durch das Mikroskop wurden nun zunächst alle Zellkerne identifiziert und somit die einzelnen Zellen registriert. Daraufhin konnte in einem zweiten Schritt die Alexa-Fluor-Intensität jeder Zelle registriert und somit auf das Ausmaß der DNA-Synthese im jeweiligen betrachteten Zeitraum geschlossen werden. Die graphische Darstellung der Alexa-Fluor-Intensität jeder durch das Mikroskop erfassten Zelle erfolgte durch Boxplots. Da die so gewonnenen Daten nicht normalverteilt waren, erfolgte die Signifikanztestung mittels Mann-Whitney-Test. Die Darstellung der Signifikanz erfolgte nach folgendem Schema: n.s. bei $p > 0{,}05$, * bei $p \leq 0{,}05$, ** bei $p \leq 0{,}01$, *** bei $p \leq 0{,}001$ sowie **** bei $p \leq 0{,}0001$.

2.2.5 **Durchflusszytometrische Bestimmung des DNA-Gehalts von U2OS-Zellen**

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) genannt, dient der Analyse verschiedener Charakteristika von Zellen, die bei der Anwendung dieser Methode einzeln erfasst werden können. Die Zellen werden durch eine Kapillare gepresst, sodass jeweils nur eine Zelle eine bestimmte Messeinheit passiert. Dabei trifft ein Laserstrahl auf die Zelle und wird von dieser in unterschiedlichem Ausmaß gebrochen. Gemessen werden kann einerseits ein sogenannter *forward scatter*, also die Brechung des Laserstrahls in der Strahlebene, andererseits ein *sideward scatter*, also die Brechung des Strahls zu den Seiten. Dies gibt Aufschluss über die Größe der Zelle und die Komplexität des Zellinhalts. Zudem ist über die Anwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, die nach Anregung durch einen Laser bestimmter Wellenlänge ein detektierbares Licht anderer Wellenlänge emittieren, auch eine Analyse weiterer Charakteristika der Zelle möglich.

2.2.5.1 Bestimmung des DNA-Gehalts mittels eindimensionaler Durchflusszytometrie

Der DNA-Gehalt einer Zelle kann durchflusszytometrisch durch den Einsatz eines fluoreszierenden Farbstoffs bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde Propidiumiodid (PI) eingesetzt, das nach Permeabilisierung der fixierten Zellen in die DNA und RNA dieser Zellen interkaliert und somit die gemessene Intensität des Farbstoffs mit der Menge an Nukleinsäuren korreliert. Da hier nur der DNA-Gehalt bestimmt werden sollte, wurde

die vorhandene RNA vor der Zugabe des PI durch RNasen degradiert. Somit war durch die gemessene Intensität auf den Replikationsstatus der Zellen zu schließen, da Zellen vor dem Eintritt in die S-Phase halb so viel DNA enthalten wie Zellen nach Abschluss der S-Phase. Während der laufenden Replikation liegt der DNA-Gehalt der Zellen zwischen diesen beiden Eckpunkten.

Zunächst wurden die in Zellkulturschalen kultivierten U2OS-Zellen nach Protokoll des jeweiligen Experiments behandelt. Danach wurden der Überstand aus Zellkulturmedium und die mit 500 µl Trypsin vom Untergrund gelösten Zellen in ein Falcon-Röhrchen transferiert und bei 1.800 rpm für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde sodann verworfen und das Zell-Pellet in 500 µl kaltem PBS auf Eis resuspendiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte anschließend mit tropfenweiser Zugabe von 1500 µl eiskaltem Ethanol unter konstanter Durchmischung auf dem Vortex-Gerät und Übernacht-Inkubation bei -20°C. Durch diese Ethanol-Fixierung waren die Zellen auch ausreichend permeabilisiert für die Anwendung von PI.

Um vorhandene Desoxyribonukleasen (DNasen) in den zu untersuchenden Zellen zu inaktivieren, wurden diese für 10 Minuten bei 70°C erhitzt und danach bei 4°C kalt gestellt. Die Degradierung von RNA erfolgte nun durch die Zugabe von 100 µl RNase-Lösung mit einer Konzentration von 1mg/ml und Inkubation bei 37°C für 30 Minuten. Direkt vor der durchflusszytometrischen Untersuchung wurden 6 µl PI pro Probe zu den Zellen gegeben und diese gut vermischt. Die Messung erfolgte mit dem Gerät EasyCyte plus von Guava Technologies (Millipore). Die Analyse erfolgte mit der Software Guava Express von Millipore, Merck.

2.2.5.2 Durchflusszytometrische Bestimmung neu synthetisierter DNA mittels EdU

Um in einer durchflusszytometrischen Messung sowohl den Gesamt-DNA-Gehalt einer Zelle als auch die in einem bestimmten Zeitraum während der Replikation neu synthetisierte DNA bestimmen zu können, war eine Behandlung der Zellen mittels zweier verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe nötig. Zum einen wurde wie bereits in 2.2.5.1 beschrieben das interkalierende Agens PI zur Darstellung des Gesamt-DNA-Gehaltes einer Zelle verwendet. Zum anderen erfolgte der Einsatz des Thymidin-Analogons EdU, das während der Replikation in die neu synthetisierte DNA eingebaut und in einer anschließenden Kupfer-katalysierten Click-Reaktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 647 gekoppelt wird. Zu diesem Zweck wurde das Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 647 Flow Cytometry Assay Kit verwendet.

Zunächst wurden die in Zellkulturschalen kultivierten U2OS-Zellen nach Protokoll des jeweiligen Experiments behandelt. In den letzten 2 h des Protokolls wurde EdU zu einer Gesamtkonzentration von 10 µM hinzugegeben. Die Ernte der Zellen erfolgte analog zum Vorgehen aus 2.2.5.1 durch Trypsinisierung und Zentrifugation. Zur Fixierung wurde der Überstand nach Zentrifugation verworfen und das Zell-Pellet in 3 ml 1%-BSA in PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Wasch-Lösung verworfen und die Zellen in 100 µl der paraformaldehydhaltigen Fixierungslösung des Kits lichtgeschützt für 15 Minuten resuspendiert und fixiert. Es folgte das erneute Waschen der Zellen wie oben beschrieben. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl der saponinbasierten Permeabilisierungslösung des Kits für 15 Minuten inkubiert, während die Click-Reaktionslösung nach Anleitung vorbereitet wurde. Von dieser wurden daraufhin 500 µl pro Probe hinzugegeben und gut vermischt sowie lichtgeschützt für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen, zentrifugiert und der Überstand entfernt.

Die anschließende PI-Färbung erfolgte analog zum Vorgehen in 2.2.5.1 zunächst mit Inaktivierung von DNasen bei 70°C, dann der Degradierung von RNA durch RNasen und dem Hinzufügen von 6 µl PI direkt vor der durchflusszytometrischen Messung. Diese erfolgte mit dem Gerät FACS Canto II von BD Biosciences. Zur Analyse wurde die Software FACSDiva in der Version 6.1.3, ebenfalls von BD Biosciences, verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Nutlin-3 induziert das p53-responsive Gen *p21* (*CDKN1A*) und verhindert den Eintritt in die S-Phase erst nach langer Behandlungsdauer

Um die Rolle von p53 in der S-Phase einer Zelle untersuchen zu können, musste in einem ersten Versuch ein geeignetes System gefunden werden, in dem sich die Aktivierung von p53 und die S-Phase gleichzeitig beobachten lassen. Eine geeignete Zelllinie stellten unter diesen Voraussetzungen U2OS-Zellen dar, bei denen es sich um humane Osteosarkomzellen mit wildtypischem p53 handelt (Diller et al. 1990; Niforou et al. 2008).

In bisherigen Forschungsarbeiten wurde eine Aktivierung von p53 meist durch eine gezielte Schädigung der Zelle ausgelöst, beispielsweise durch UV-Bestrahlung oder die Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit aber vor allem die Funktion von p53 in einer weitgehend ungestörten S-Phase charakterisiert werden sollte, stellte sich hier die Frage nach einer anderen geeigneten Methode der p53-Aktivierung.

Ein vielversprechendes Agens zur Aktivierung von p53 ist unter diesen Gesichtspunkten Nutlin-3. In der Zelle blockiert es spezifisch die p53-Bindungstasche von MDM2 und verhindert auf diese Weise die Interaktion der beiden Proteine. In der Folge einer verminderten Degradation steigen die Spiegel an freiem und aktivem p53, ohne dass eine Zellschädigung stattgefunden hat. Es müsste sich also durch die Behandlung der U2OS-Zellen mit Nutlin-3 eine Induktion bekannter p53-responsiver Gene feststellen lassen.

Eines dieser Gene ist *p21* (*CDKN1A*), dessen Produkt eine wichtige Rolle in der Arretierung des Zellzyklus spielt (siehe Kapitel 1.1.2.1). Aufgrund dessen war in einem weiteren Versuch ebenfalls zu klären, ob durch die Behandlung mit Nutlin-3 und der im Folgenden zu erwartenden Induktion von *p21* der Eintritt in die S-Phase grundsätzlich erfolgen kann.

3.1.1 Die Behandlung mit Nutlin-3 führt zur Induktion des p53-responsiven Gens *p21* (*CDKN1A*) in U2OS-Zellen

Zunächst sollte in einem Experiment untersucht werden, ob Nutlin-3 die erwartete Wirkung im Sinne einer Aktivierung des Tumorsuppressors p53 in U2OS-Zellen zeigt und welche Dosierung dafür notwendig ist.

Dazu wurden die Zellen für 6 h mit Nutlin-3 in einer Konzentration von 10 µM oder 20 µM inkubiert. Da Nutlin-3 in DMSO gelöst ist, diente die Inkubation mit DMSO als Negativkontrolle. Anschließend erfolgten die Isolation der RNA sowie eine cDNA-Synthese (siehe Kapitel 2.2.2.1 und folgende). Mithilfe einer qRT-PCR, in der spezifische Primer für *p21* verwendet wurden, ließ sich die Expression dieses p53-Zielgens quantifizieren.

Das Ergebnis dieses Experiments ist in **Abbildung 2** dargestellt. Wie erwartet ließ sich *p21* (*CDKN1A*) durch die Behandlung mit Nutlin-3 induzieren. Sowohl in einer Konzentration von 10 µM als auch von 20 µM war eine etwa dreifach erhöhte Genexpression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle festzustellen; der Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen unterschiedlicher Konzentrationen war minimal. Aus diesem Grund wurde die Entscheidung getroffen, Nutlin-3 in allen folgenden Experimenten in einer Konzentration von 10 µM einzusetzen.

Es blieb somit festzuhalten, dass sich die Behandlung mit Nutlin-3 als wirksam in Bezug auf eine Induktion des p53-responsiven Gens *p21* auf Ebene der mRNA erwies. Ob auch weitere p53-responsive Gene durch eine solche Behandlung induziert werden können, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden. Ebenso blieb offen, ob eine gesteigerte Expression von mRNA auch zur Akkumulation der entsprechenden Proteine führt. Zudem war zu klären, ob durch die Behandlung mit Nutlin-3 tatsächlich eine Akkumulation von p53 stattfindet.

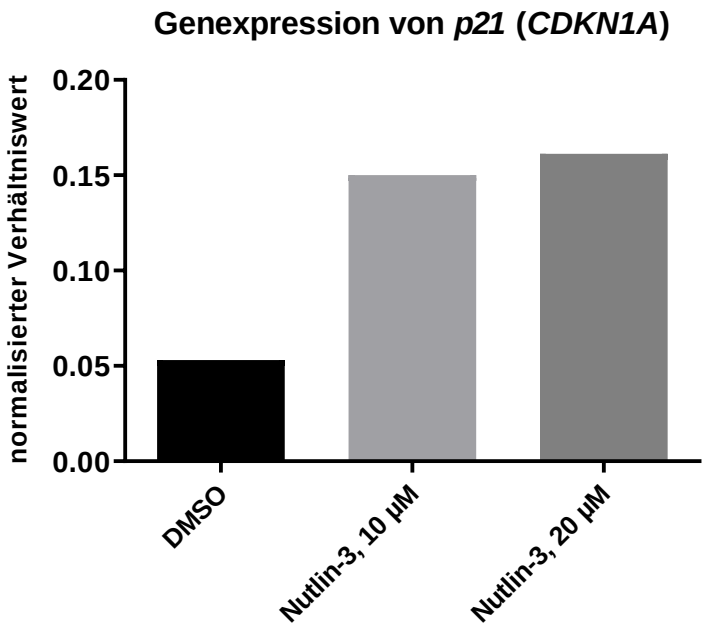

Abbildung 2: Behandlung von U2OS-Zellen mit Nutlin-3: Expression des p53-responsiven Gens *p21* (*CDKN1A*)

U2OS-Zellen wurden für 6 h mit Nutlin-3 in einer Konzentration von 10 µM und 20 µM behandelt. Da Nutlin-3 in DMSO gelöst ist, diente die Behandlung mit DMSO als Negativkontrolle. Im Anschluss an die Behandlung erfolgte die Isolation der RNA, eine reverse Transkription sowie eine quantitative Realtime-PCR mit spezifischen Primern für das p53-responsive Gen *p21* (*CDKN1A*). Gezeigt ist die Genexpression von *p21* (*CDKN1A*) in Form eines Verhältniswertes, der auf die Expression des konstitutiv exprimierten Haushaltsgens *36B4* normiert ist.

3.1.2 Die Behandlung von U2OS-Zellen mit Nutlin-3 verhindert den Eintritt in die S-Phase erst nach langer Inkubationsdauer

Eine zweite wichtige Bedingung für die Untersuchung der Funktion des Tumorsuppressors p53 in der S-Phase war, dass durch die Aktivierung von p53 durch eine geeignete Inkubationsdauer mit Nutlin-3 der Eintritt in die S-Phase nicht verhindert wird.

Um den Einfluss der Nutlin-3-Behandlung auf den Eintritt in die S-Phase genauer zu bestimmen, wurden in einem weiteren Experiment U2OS-Zellen für unterschiedlich lange Zeit mit Nutlin-3 in einer Konzentration von 10 µM inkubiert. Da dieses in DMSO gelöst ist, diente die Behandlung mit DMSO als Negativkontrolle. In den jeweils letzten zwei Stunden der Behandlung wurde EdU in einer Konzentration von 10 µM hinzugefügt, sowie jeweils eine Gruppe von Zellen als Negativkontrolle weiterhin ohne EdU inkubiert, um das Hintergrundrauschen der Mikroskopaufnahmen messen zu können. Zum Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen mit einer formaldehydhaltigen Lösung fixiert und anschließend permeabilisiert. In einer Click-Reaktion wurde der Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 an EdU gekoppelt. Um alle Zellkerne mit dem Mikroskop detektieren zu können, wurde außerdem der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 eingesetzt, die die Gesamt-DNA der Zellen markierte. Mithilfe des BD Pathway Mikroskops wurde dann die Alexa-Fluor-Intensität einer jeden Zelle bestimmt. Anhand dieses Wertes ließ sich auf die Menge des während der Replikation inkorporierten EdUs und somit die Replikationsaktivität insgesamt schließen. Die mittlere Alexa-Fluor-Intensität jeder der betrachteten Gruppen ist in **Abbildung 3 A** aufgetragen. Um die Ergebnisse der drei Konditionen des Experiments besser miteinander vergleichen zu können, wurde die mittlere Intensität der mit Nutlin-3 behandelten Zellen zusätzlich auf die mittlere Intensität der DMSO-Kontrolle normiert, indem das Verhältnis Alexa-Fluor-Intensität (Nutlin-3) : Alexa-Fluor-Intensität (DMSO) gebildet wurde.

Das Ergebnis dieser Normierung ist in **Abbildung 3 B** dargestellt. Nach einer Behandlungsdauer von 6 h zeigte sich noch keine signifikante Reduktion der Alexa-Fluor-Intensität in Nutlin-3-behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Der Einbau von EdU in die neu synthetisierte DNA betrug in den behandelten Zellen im Mittel 94,1%

des Kontrollwertes. Nach einer Behandlungsdauer von 12 h zeigte sich eine signifikante Abnahme der Alexa-Fluor-Intensität, der gemessene Wert betrug nun nur noch 52,4% des Kontrollwertes. Noch stärker war der Effekt der Nutlin-3-Behandlung nach einer Inkubationszeit von 24 h zu beobachten; es lag eine signifikante Reduktion der Alexa-Fluor-Intensität auf 35, 5% des Kontrollwertes vor.

Es ließ sich durch dieses Experiment somit der erwartete negative Einfluss einer Aktivierung von p53 auf den Eintritt in die S-Phase feststellen. Wichtig für die vorliegende Arbeit war jedoch, dass die Behandlung mit Nutlin-3 den Eintritt in die S-Phase erst nach einer Inkubationsdauer von mindestens 12 h signifikant reduzierte und selbst nach 24 h keinen vollständigen G1/S-Arrest auslösen konnte. Nach einer Behandlungsdauer von 6 h, wie sie für die Induktion des Zielgens *p21 (CDKN1A)* ausreichend war, wurde der Eintritt in die S-Phase nicht signifikant beeinflusst. Die Inkubation mit Nutlin-3 erwies sich also als geeignet, in U2OS-Zellen gleichzeitig die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 und die S-Phase untersuchen zu können.

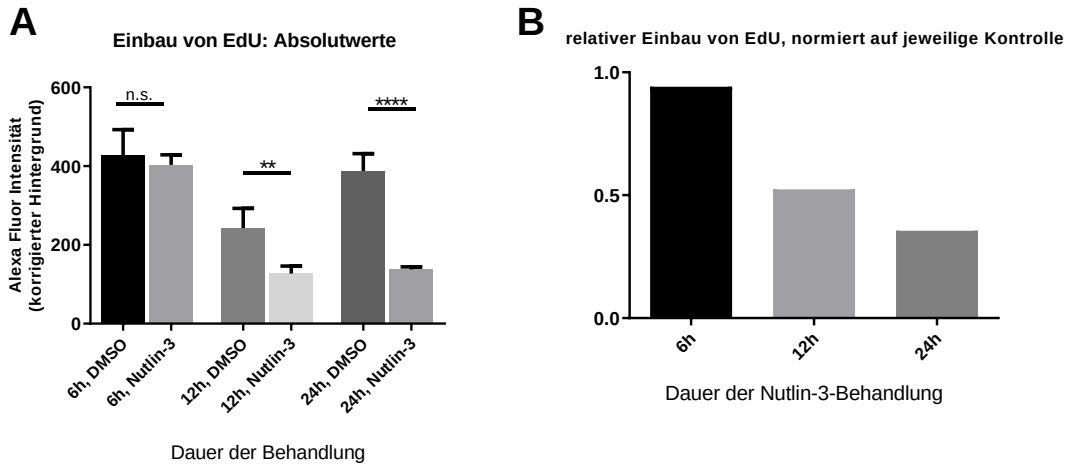

Abbildung 3: Behandlung von U2OS-Zellen mit Nutlin-3: Einfluss auf DNA-Replikation

A: Inkorporation von EdU unter verschieden langer Behandlungsdauer: U2OS-Zellen wurden für unterschiedlich lange Zeitspannen mit 10 µM Nutlin-3 behandelt. Da Nutlin-3 in DMSO gelöst ist, diente die Behandlung mit DMSO als Negativkontrolle. In den jeweils letzten zwei Stunden der Behandlung wurde EdU, das als Thymidin-Analogon im Rahmen der DNA-Replikation inkorporiert wird, in einer Konzentration von 10 µM hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit einer formaldehydhaltigen Lösung fixiert und das EdU an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 gekoppelt. Die Gesamt-DNA wurde mit Hoechst 33342 angefärbt, um alle Zellkerne zu markieren. Die Erfassung der jeweiligen emittierten Lichtsignale erfolgte mithilfe des BD Pathway Mikroskops. Mithilfe einer EdU-Negativkontrolle wurde der Hintergrund korrigiert.

B: relative Inkorporation von EdU, normiert auf jeweilige Kontrolle: Gezeigt ist der relative Einbau von EdU zu den verschiedenen Zeitpunkten, errechnet aus dem Verhältnis Alexa-Fluor-Intensität (Nutlin-3) : Alexa-Fluor-Intensität (DMSO).

3.2 Die Anwendung eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert U2OS-Zellen am G1/S-Übergang

Ein geeignetes Agens, um den Tumorsuppressor p53 und die S-Phase einer Zelle gleichzeitig untersuchen zu können, wurde in einem ersten Experiment bereits gefunden. Da sich in exponentiell wachsenden Zellen jedoch immer nur ein Anteil dieser Zellen in der S-Phase befindet, erschien es sinnvoll, für die folgenden Experimente den Zellzyklus zu synchronisieren. Es sollte dadurch erreicht werden, in einem bestimmten Zeitraum möglichst viele Zellen während der S-Phase untersuchen zu können. Als probate Methode erschien die Anwendung eines doppelten Thymidin-Blocks, der in der bisherigen Forschung bereits seit Langem zu diesem Zweck angewendet wird (siehe Kapitel 2.2.1.6). Die Anwendbarkeit eines doppelten Thymidin-Blocks im vorgesehenen Modellsystem mit U2OS-Zellen sollte in einem Experiment bestätigt werden.

Dazu wurden U2OS-Zellen für 16 h mit Thymidin in einer Konzentration von 2 mM inkubiert. Nach diesem ersten Thymidin-Block wurde der Überschuss durch viermaliges Waschen der Zellen mit PBS entfernt und diese für 8 h in Zellkultur-medium inkubiert. Darauf folgte die Anwendung eines zweiten Thymidin-Blocks, ebenfalls in Form einer 16-stündigen Inkubation mit 2 mM Thymidin. Eine erste Gruppe von Zellen wurde bereits zum Ende dieses zweiten Blocks trypsinisiert, in Suspension gebracht und mit -20°C kaltem Ethanol fixiert, um später den DNA-Gehalt der Zellen zu diesem Zeitpunkt bestimmen zu können. Zwei weitere Gruppen von Zellen wurden durch erneutes viermaliges Waschen mit PBS aus dem Thymidin-Block entlassen. Eine dieser Gruppen wurde 2 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks fixiert, die andere 4 h danach. Die Fixierung aller Zellen mittels -20°C kaltem Ethanol erfolgte über Nacht. Am folgenden Tag wurde zur Markierung der DNA Propidiumiodid hinzugefügt und eine durchflusszytometrische Messung durchgeführt. In dieser Messung wurde der Gesamt-DNA-Gehalt der Zellen bestimmt.

Das Ergebnis des Experiments ist in **Abbildung 4** dargestellt. Es war festzustellen, dass zum Endzeitpunkt des zweiten Thymidin-Blocks die überwiegende Anzahl der Zellen in der Histogramm-Darstellung einen G1-typischen DNA-Gehalt aufwies. Zwei Stunden nach Aufhebung des Thymidin-Blocks hatte sich dieses Muster noch sehr wenig geändert, es zeigte sich lediglich eine geringe Verschiebung des Gesamt-DNA-Gehalts im Sinne einer langsam beginnenden Replikationstätigkeit. Vier Stunden nach Aufhebung des Thymidin-Blocks konnte jedoch eine deutliche Verschiebung des Musters im Histogramm beobachtet

werden, es zeigte sich ein typisches Histogramm für Zellen in der S-Phase mit einem DNA-Gehalt zwischen G1 und G2.

Es ließ sich demnach durch dieses Experiment bestätigen, dass die Anwendung eines doppelten Thymidin-Blocks in U2OS-Zellen geeignet ist, diese am Beginn der S-Phase in ihrem Zellzyklus anzuhalten und nach Aufhebung des Blocks synchron in die S-Phase laufen zu lassen.

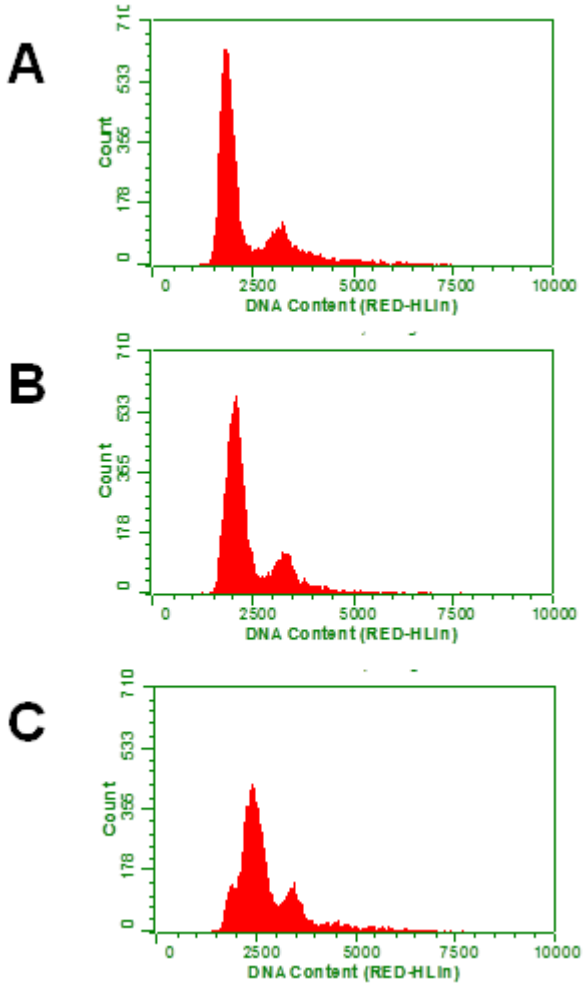

Abbildung 4: Anwendung eines doppelten Thymidin-Blocks zur Synchronisation von U2OS-Zellen: Darstellung des DNA-Gehalts mittels Durchflusszytometrie

U2OS-Zellen wurden zunächst für 16 h mit Thymidin in einer Konzentration von 2 mM inkubiert. Nach viermaligem Waschen der Zellen mit PBS folgten 8 h Inkubationszeit in Zellkulturmedium. Anschließend wurde für weitere 16 h mit 2 mM Thymidin inkubiert. Manche der Zellen wurden aus diesem zweiten Thymidin-Block durch viermaliges Waschen mit PBS entlassen. Drei Gruppen von Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert: direkt nach Ende des zweiten Thymidin-Blocks zum Zeitpunkt 0 (**A**), 2 h nach Aufhebung des Blocks (**B**) sowie 4 h nach Aufhebung des Blocks (**C**). Dazu wurden die Zellen trypsinisiert, in Suspension gebracht und mit -20°C kaltem Ethanol über Nacht fixiert. Am nächsten Tag erfolgten die Anfärbung der gesamten DNA mit Propidiumiodid sowie die durchflusszytometrische Messung.

3.3 Eine Nutlin-3-Behandlung während der S-Phase verhindert nicht das Voranschreiten der DNA-Replikation in U2OS-Zellen

In einem voranstehenden Experiment wurde untersucht, wie sich die Inkubation mit Nutlin-3 und die damit einhergehende Aktivierung von p53 auf die DNA-Replikation asynchroner Zellen auswirkt. Für eine Charakterisierung der Funktion des Tumorsuppressors p53 in der S-Phase war es jedoch wichtig, in einem weiteren Experiment nun zu untersuchen, wie sich die p53-Aktivierung auf Zellen auswirkt, die zum Zeitpunkt der Applikation gerade die S-Phase durchlaufen. Zu klären war, ob die begonnene DNA-Replikation auch im Beisein hoher p53-Spiegel fortgeführt wird, oder ob es im Sinne eines S-Phasen-Arrests zum Stopp dieses Prozesses kommt.

Dazu wurden U2OS-Zellen zunächst mithilfe eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert: Es erfolgte eine Inkubation mit Thymidin in einer Konzentration von 2 mM für 16 h. Dieses wurde durch dreimaliges Waschen mit Kulturmedium wieder entfernt und die Zellen für 8 h mit normalem Zellkulturmedium inkubiert. Anschließend folgte eine erneute Inkubation mit 2 mM Thymidin für 16 h. Am Ende dieser Behandlung wurde eine Gruppe von Zellen durch dreimaliges Waschen mit Zellkulturmedium aus dem Thymidin-Block befreit, in einer anderen Gruppe wurde das Thymidin im Kulturmedium belassen und der Thymidin-Block nicht aufgehoben. Zusätzlich zu den beiden Gruppen synchronisierter Zellen wurde im Folgenden eine Gruppe asynchroner Zellen zum Vergleich mit der S-Phase mitbehandelt. 2,5 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks in einer der Gruppen wurden alle Gruppen zeitgleich für 5,5 h mit Nutlin-3 in einer Konzentration von 10 µM inkubiert. Da Nutlin-3 in DMSO gelöst ist, diente die Behandlung mit DMSO als Negativkontrolle. In den letzten zwei Stunden der Inkubationszeit wurde EdU in einer Konzentration von 10 µM hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen mit einer formaldehydhaltigen Lösung fixiert und permeabilisiert. Durch eine Click-Reaktion erfolgte die Kopplung des EdU mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488. Außerdem wurde die Gesamt-DNA durch Hoechst 33342 markiert, um die Detektierbarkeit aller Zellkerne durch das Mikroskop zu gewährleisten. Mithilfe des BD Pathway Mikroskops wurden anschließend alle Zellkerne erfasst und die Alexa-Fluor-Intensität jedes einzelnen erkannten Zellkerns gemessen.

Die Verteilung dieser Intensitäten in den jeweiligen Behandlungsgruppen ist in **Abbildung 5** dargestellt. In der Gruppe der asynchronen Zellen ließ sich eine geringe Replikationstätigkeit ausmachen. Bereits in Kapitel 3.1.2 wurde gezeigt, dass eine kurze Inkubationsdauer mit Nutlin-3 keine signifikanten Auswirkungen auf die DNA-Replikation hat. Dieses Ergebnis ließ sich nun bestätigen: Auch in diesem Experiment waren bei der

angewandten Inkubationsdauer von 5,5 h keine signifikanten Unterschiede zwischen der Replikationstätigkeit der mit Nutlin-3 und der mit DMSO behandelten Zellen festzustellen.
In der Gruppe der synchronisierten und anschließend nicht vom zweiten Thymidin-Block befreiten Zellen war sämtlich eine Alexa-Fluor-Intensität zu messen, die der des Hintergrundrauschens entsprach. Es waren keine Unterschiede zwischen den mit Nutlin-3 und den mit DMSO behandelten Zellen festzustellen. Demzufolge erfolgte in diesem Versuchsansatz praktisch keine Inkorporation von EdU, was einerseits die Wirksamkeit des Thymidin-Blocks unterstrich, andererseits aufgrund der Kompetition von EdU und Thymidin zu erwarten gewesen war.
In der Gruppe der aus dem Thymidin-Block befreiten Zellen war anhand der hohen Werte der gemessenen Alexa-Fluor-Intensität eine deutliche Replikationstätigkeit auszumachen. Es ließ sich somit, frühere Experimente bestätigend, beobachten, dass sich durch den Thymidin-Block eine große Anzahl an Zellen in der S-Phase befand. Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied in der medianen Alexa-Fluor-Intensität zwischen den mit Nutlin-3 und den mit DMSO behandelten Zellen: Eine Inkubation mit Nutlin-3 während der S-Phase führte in diesem Experiment zu einer signifikant geringeren medianen Alexa-Fluor-Intensität und demzufolge Replikationstätigkeit im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings ließ sich ebenfalls festhalten, dass eine p53-Aktivierung durch Nutlin-3-Behandlung von U2OS-Zellen in der S-Phase nicht zum Stillstand der DNA-Replikation führte. Es blieb zu klären, wodurch dieser Unterschied selbst bei kurzer Inkubationsdauer mit Nutlin-3 hervorgerufen wurde. Zu evaluieren blieb zudem, ob p53 unter diesen Versuchsbedingungen akkumuliert und Zielgene wie beispielsweise *p21* (*CDKN1A*) induzieren kann.

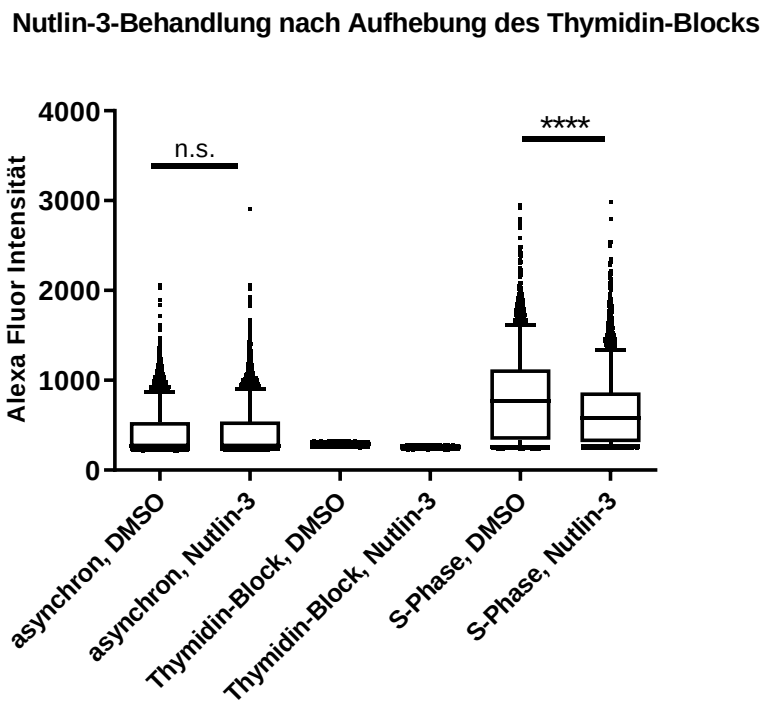

Abbildung 5: Nutlin-3-Behandlung von U2OS-Zellen nach Aufhebung des Thymidin-Blocks: Darstellung der Replikationstätigkeit anhand der Inkorporation von EdU

Zwei Gruppen von U2OS-Zellen wurden zunächst mithilfe eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert. Dies erfolgte durch Inkubation mit Thymidin in einer Konzentration von 2 mM für 16 h, anschließendem dreifachen Waschen der Zellen mit Zellkulturmedium und Inkubation in Kulturmedium für 8 h, sowie einer weiteren Inkubation mit 2 mM Thymidin für 16 h. In einer der Gruppen wurde der zweite Thymidin-Block durch erneutes dreimaliges Waschen mit Kulturmedium aufgehoben und der Eintritt in die S-Phase somit ermöglicht (S-Phase), in der anderen Gruppe wurde das Thymidin im Kulturmedium belassen und der Block somit nicht aufgehoben (Thymidin-Block). Eine Gruppe asynchroner Zellen (asynchron) diente zudem dem Vergleich der Nutlin-3-Wirkung auf asynchrone Zellen mit der Wirkung auf Zellen in der S-Phase. 2,5 h nach der Aufhebung des Thymidin-Blocks in der S-Phasen-Gruppe wurden Zellen aller Gruppen zeitgleich mit Nutlin-3 in einer Konzentration von 10 µM behandelt und für 5,5 h inkubiert. Da Nutlin-3 in DMSO gelöst ist, diente die Behandlung mit DMSO als Negativkontrolle. In den letzten 2 h dieser Inkubation wurde EdU in einer Konzentration von 10 µM zum Kulturmedium hinzugefügt. Anschließend wurden alle Zellen mithilfe einer formaldehydhaltigen Lösung fixiert und das EdU an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 gekoppelt. Die Gesamt-DNA wurde mit Hoechst 33342 markiert, um alle Zellkerne detektieren zu können. Die Erfassung der jeweiligen emittierten Lichtsignale erfolgte mithilfe des BD Pathway Mikroskops. Pro dargestellter Gruppe wurden mindestens 2.016 und maximal 14.166 Zellen erfasst.
Gezeigt ist die Verteilung der Alexa-Fluor-Intensität jeder einzelnen Zelle innerhalb einer Behandlungsgruppe. Die Box wird nach unten begrenzt durch die 25. Perzentile, nach oben durch die 75. Perzentile. Der Balken innerhalb der Box zeigt die Position des Medians. Die Whisker werden nach unten begrenzt durch die 5. Perzentile und nach oben durch die 95. Perzentile. Ausreißer, die außerhalb der 5. bis 95. Perzentile liegen, werden als einzelne Punkte dargestellt.

3.4 Die Behandlung mit Nutlin-3 während der S-Phase führt ebenfalls zu einer signifikanten Induktion des p53-responsiven Gens *p21*(*CDKN1A*) in U2OS-Zellen

Im vorigen Experiment konnte beobachtet werden, dass die Aktivierung von p53 durch Inkubation mit Nutlin-3 während der S-Phase ein Voranschreiten der DNA-Replikation zulässt. Es sollte nun in einem weiteren Experiment untersucht werden, ob p53 auch in der S-Phase transkriptionell aktiv ist und das Zielgen *p21* (*CDKN1A*) induzieren kann.

Zunächst wurden zwei Gruppen von Zellen mithilfe eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert. Einer 16-stündigen Inkubation der Zellen mit Thymidin in einer Konzentration von 2 mM folgte viermaliges Waschen mit PBS und eine Inkubation in Kulturmedium für 8 h. Anschließend wurden die Zellen erneut für 16 h mit 2 mM Thymidin inkubiert. Eine der Gruppen wurde aus dem zweiten Thymidin-Block durch viermaliges Waschen mit PBS befreit, in der anderen Gruppe wurde das Thymidin im Kulturmedium belassen. Zusätzlich zu den beiden Gruppen synchronisierter Zellen wurde im Folgenden eine Gruppe asynchroner Zellen mitbehandelt, um den Vergleich von S-Phase und nicht-S-Phase zu ermöglichen. 2,5 h nach dem Aufheben des Thymidin-Blocks wurden alle Zellen zeitgleich mit Nutlin-3 in einer Konzentration von 10 µM behandelt und für 5,5 h inkubiert. Da Nutlin-3 in DMSO gelöst ist, diente die Behandlung mit DMSO als Negativkontrolle. Anschließend erfolgten die Isolation der RNA und die Herstellung von cDNA. Mit der Durchführung einer qRT-PCR, in der spezifische Primer für *p21* verwendet wurden, konnte die Expression von *p21* in den verschiedenen Behandlungsgruppen quantifiziert werden. Die Werte wurden auf das Haushaltsgen *36B4* normiert, welches konstitutiv exprimiert wird.

Das Ergebnis dieses Experiments ist in **Abbildung 6** dargestellt. In allen drei Behandlungsgruppen ließ sich in diesem Experiment eine signifikante Induktion des p53-responsiven Gens *p21* (*CDKN1A*) beobachten. In asynchronen Zellen und synchronisierten Zellen, die nicht aus dem Thymidin-Block entlassen wurden, erfolgte eine etwa vierfach erhöhte Genexpression. In synchronen Zellen, die sich in der S-Phase befanden, war eine etwa 2,7-fach erhöhte Genexpression zu beobachten.

Abschließend festzuhalten war, dass in U2OS-Zellen auch in der S-Phase eine Induktion des Gens *p21 (CDKN1A)* durch die Aktivierung von p53 erfolgte. Es war in weiteren Versuchen zu klären, ob auch andere p53-responsive Gene durch Behandlung mit Nutlin-3 während der S-Phase induzierbar sind.

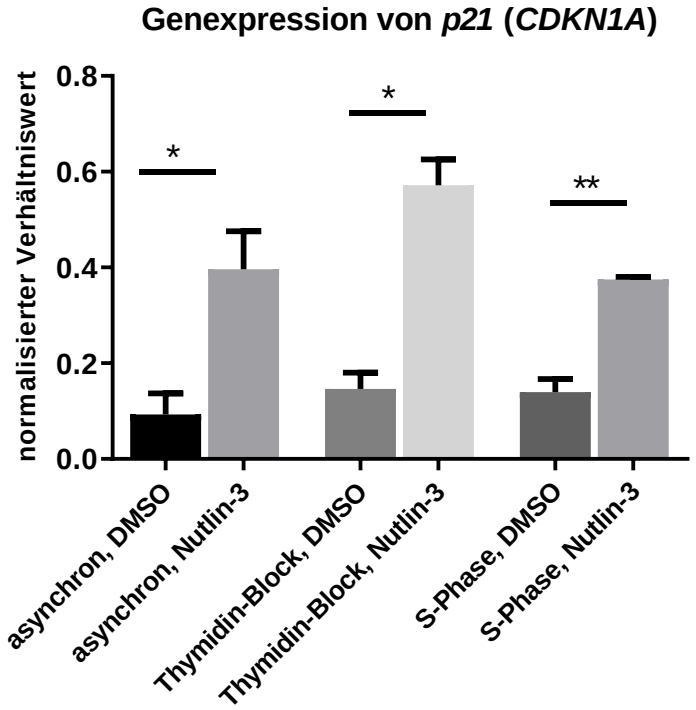

Abbildung 6: Nutlin-3-Behandlung von asynchronen und synchronisierten, sich bereits in der S-Phase befindenden U2OS-Zellen: Genexpression von *p21* (*CDKN1A*)

Zwei Gruppen von U2OS-Zellen wurden zunächst mithilfe eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert. Dies erfolgte durch Inkubation mit Thymidin in einer Konzentration von 2 mM für 16 h, anschließendem dreifachen Waschen der Zellen mit Zellkulturmedium und Inkubation in Kulturmedium für 8 h, sowie einer weiteren Inkubation mit 2 mM Thymidin für 16 h. In einer der Gruppen wurde der zweite Thymidin-Block durch erneutes dreimaliges Waschen mit Kulturmedium aufgehoben und der Eintritt in die S-Phase somit ermöglicht (S-Phase), in der anderen Gruppe wurde das Thymidin im Kulturmedium belassen und der Block somit nicht aufgehoben (Thymidin-Block). Eine Gruppe asynchroner Zellen (asynchron) diente zudem dem Vergleich der Nutlin-3-Wirkung auf asynchrone Zellen mit der Wirkung auf Zellen in der S-Phase. 2,5 h nach der Aufhebung des Thymidin-Blocks wurden Zellen aller Gruppen zeitgleich mit Nutlin-3 in einer Konzentration von 10 µM behandelt und für 5,5 h inkubiert. Da Nutlin-3 in DMSO gelöst ist, diente die Behandlung mit DMSO als Negativkontrolle.
Im Anschluss an die Behandlung erfolgte die Isolation der RNA, eine reverse Transkription sowie eine quantitative Realtime-PCR mit spezifischen Primern für das p53-responsive Gen *p21* (*CDKN1A*). Gezeigt ist die Genexpression von *p21* (*CDKN1A*) in Form eines Verhältniswertes, der auf die Expression des konstitutiv exprimierten Haushaltsgens *36B4* normiert ist.

3.5 Die Behandlung mit Nutlin-3 während der S-Phase führt auf Proteinebene zur Akkumulation von p53 und p21 in U2OS-Zellen

In bisherigen Experimenten konnte eine Induzierbarkeit des p53-responsiven Gens *p21* durch Behandlung mit Nutlin-3 auf mRNA-Ebene gezeigt werden. In einem weiteren Experiment sollte nun untersucht werden, ob die Induktion von p21 auch auf Protein-

ebene stattfindet. Weitere Aufmerksamkeit galt zudem der Frage, ob durch die Inkubation mit Nutlin-3 das Protein p53 in den Zellen tatsächlich akkumuliert.

Dazu wurden wie bisher zunächst zwei Gruppen von Zellen mittels eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert. Die erste Inkubation mit Thymidin in einer Konzentration von 2 mM erfolgte für 16 h, woraufhin das Thymidin durch vierfaches Waschen der Zellen mit PBS entfernt wurde und die Zellen für 8 h mit normalem Zellkulturmedium inkubiert wurden. Für einen zweiten 16-stündigen Thymidin-Block erfolgte erneut eine Behandlung mit Thymidin in einer Konzentration von 2 mM. Dieses wurde in einer Gruppe von Zellen durch viermaliges Waschen mit PBS entfernt, in der zweiten Gruppe wurde es im Kulturmedium belassen und diese Zellen folglich nicht aus dem Thymidin-Block befreit. Für die weitere Vorgehensweise wurde sodann eine Gruppe asynchroner Zellen mitbehandelt. 2,5 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks wurden Zellen aller Gruppen zeitgleich mit Nutlin-3 in einer Konzentration von 10 µM für 5,5 h inkubiert. Da Nutlin-3 in DMSO gelöst ist, diente die Behandlung mit DMSO als Negativkontrolle. Anschließend wurden die Zellen in RIPA-Puffer lysiert und geerntet. Nach Adjustierung der Proteinkonzentration in den einzelnen Proben wurden gleiche Proteinmengen auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und in einer SDS-PAGE ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Im Rahmen eines Western Blots wurden die aufgetrennten Proteinfraktionen auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Diese wurde anschließend mit spezifischen Antikörpern für p53, p21 sowie Aktin inkubiert und die Proteine nach weiteren Schritten detektiert. Die Anfärbung des konstitutiv exprimierten Proteins Aktin diente als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung des Polyacrylamid-Gels und eine fehlerfreie Durchführung der SDS-PAGE.

Das Ergebnis dieses Experiments ist in **Abbildung 7** dargestellt. Zu beobachten war zunächst eine gleichmäßige Aktin-Bande, die somit eine korrekte Durchführung der Gelelektrophorese mit gleichen Proteinmengen bestätigte. Eine Akkumulation von p53 konnte in allen Proben Nutlin-3-behandelter Zellen der jeweiligen Behandlungsgruppen nachgewiesen werden; es war jedoch auffällig, dass diese in asynchronen Zellen etwas schwächer ausfiel als in den synchronisierten Zellen. Die deutlichste Akkumulation von p53 war in den Zellen zu sehen, die sich in der S-Phase befanden.

Auch eine Akkumulation von p21 war in allen Proben Nutlin-3-behandelter Zellen der jeweiligen Behandlungsgruppen zu sehen. Die schwächste Akkumulation war hier jedoch in den synchronisierten und nicht aus dem Thymidin-Block entlassenen Zellen zu beobachten, die stärkste Akkumulation wiederum in den sich in der S-Phase befindenden

Zellen. In den mit DMSO behandelten Zellen war keine Akkumulation von p53 oder von p21 über einen bestimmten Grundwert hinaus festzustellen.

Es blieb abschließend also festzuhalten, dass durch die Behandlung mit Nutlin-3 sowohl in der S-Phase einer Zelle als auch in asynchronen Zellen, die sich in verschiedenen Zellzyklusphasen befinden, eine Akkumulation von p53 stattfand. Ebenso erfolgte in beiden untersuchten Konditionen eine Induktion des p53-responsiven Gens *p21* auch auf Proteinebene.

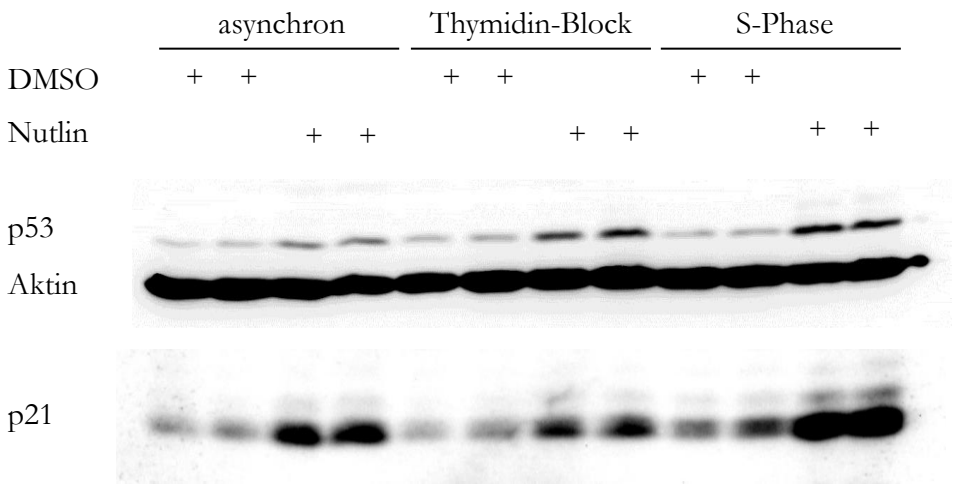

Abbildung 7: Nutlin-3-Behandlung von asynchronen und synchronisierten, sich bereits in der S-Phase befindenden U2OS-Zellen: Betrachtung der Wirkung auf Proteinebene

Zwei Gruppen von U2OS-Zellen wurden zunächst mithilfe eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert. Dies erfolgte durch Inkubation mit Thymidin in einer Konzentration von 2 mM für 16 h, anschließendem dreifachen Waschen der Zellen mit Zellkulturmedium und Inkubation in Kulturmedium für 8 h, sowie einer weiteren Inkubation mit 2 mM Thymidin für 16 h. In einer der Gruppen wurde der zweite Thymidin-Block durch erneutes dreimaliges Waschen mit Kulturmedium aufgehoben und der Eintritt in die S-Phase somit ermöglicht (S-Phase), in der anderen Gruppe wurde das Thymidin im Kulturmedium belassen und der Block somit nicht aufgehoben (Thymidin-Block). Eine Gruppe asynchroner Zellen (asynchron) diente zudem dem Vergleich der Nutlin-3-Wirkung auf asynchrone Zellen mit der Wirkung auf Zellen in der S-Phase. 2,5 h nach der Aufhebung des Thymidin-Blocks wurden Zellen aller Gruppen zeitgleich mit Nutlin-3 in einer Konzentration von 10 µM behandelt und für 5,5 h inkubiert. Da Nutlin-3 in DMSO gelöst ist, diente die Behandlung mit DMSO als Negativkontrolle.

Im Anschluss an die Behandlung erfolgte die Lyse der Zellen in RIPA-Puffer, eine Adjustierung der Proteinkonzentrationen in den jeweiligen Zelllysaten und die Durchführung einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die somit nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine wurden im Folgenden auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet und mit spezifischen Antikörpern für p53, p21 und Aktin inkubiert. Die Anfärbung des konstitutiv vorhandenen Proteins Aktin diente hier als Ladekontrolle für die korrekte Durchführung der Gelelektrophorese mit gleichen Proteinkonzentrationen.

3.6 Die Behandlung mit Nutlin-3 während der S-Phase induziert weitere bekannte p53-responsive Gene in U2OS-Zellen

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Nutlin-3 in U2OS-Zellen zur Akkumulation von p53 führt und dass das p53-responsive Gen *p21*(*CDKN1A*) durch diese Behandlung sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene induziert wird. Diese Beobachtungen waren in ihrer Tendenz unabhängig von der Phase des Zellzyklus; sie waren sowohl bei Behandlung in der S-Phase als auch bei Behandlung asynchroner Zellen auszumachen. Es sollten im Folgenden weitere bekannte p53-responsive Gene auf eine Induzierbarkeit während der S-Phase untersucht werden, um abschätzen zu können, ob in dieser Phase des Zellzyklus ein eingeschränktes Funktionsspektrum des Tumorsuppressors vorliegt oder ob dieser unabhängig von der Zellzyklusphase seine Zielgene induzieren kann.

Für dieses Experiment wurden wie zuvor zunächst zwei Gruppen von U2OS-Zellen mittels eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert. Eine der Gruppen wurde durch viermaliges Waschen mit PBS aus dem Thymidin-Block entlassen, in der anderen Gruppe wurde das Thymidin im Kulturmedium belassen und der Thymidin-Block somit nicht aufgehoben. Ab diesem Zeitpunkt wurde zusätzlich eine Gruppe asynchroner Zellen in den Versuch mit aufgenommen, um die Induzierbarkeit während der S-Phase mit der in anderen Phasen des Zellzyklus vergleichen zu können. 2,5 h nach der Aufhebung des Thymidin-Blocks wurden Zellen aller Gruppen mit Nutlin-3 in einer Konzentration von 10 µM behandelt und für 5,5 h inkubiert. Da Nutlin-3 in DMSO gelöst ist, diente die Behandlung damit als Negativkontrolle. Im Anschluss an die Inkubation mit Nutlin-3 wurde die RNA isoliert und es erfolgte eine reverse Transkription. Die somit erhaltene cDNA wurde im Folgenden zur Untersuchung bestimmter p53-responsiver Gene verwendet.

3.6.1 Die Behandlung mit Nutlin-3 während der S-Phase induziert die Expression des p53-responsiven Gens *PUMA* (*BBC3*) auf mRNA-Ebene in U2OS-Zellen

Ein bekanntes p53-responsives Gen ist *PUMA* (*p53-upregulated modulator of apoptosis*, auch *BBC3*), bei dessen Genprodukt es sich um ein proapoptotisches Protein aus der Bcl-2 Familie handelt (siehe Kapitel 1.1.2.4).

Die Quantifizierung der Genexpression von *PUMA (BBC3)* sowie *36B4* erfolgte mithilfe einer qRT-PCR unter Verwendung *36B4*- und *PUMA*-spezifischer Primer. Durch die

Bestimmung der Expression des konstitutiv exprimierten Haushaltsgens *36B4* konnten die Werte für *PUMA* normiert werden. Das Ergebnis ist in **Abbildung 8 A** dargestellt.
In allen drei Behandlungsgruppen konnte eine Induktion durch die Behandlung mit Nutlin-3 festgestellt werden. Es fiel dabei auf, dass die durch Nutlin-3 induzierte Genexpression in allen drei Fällen einen normierten Verhältniswert von etwa 0,04 annahm, die Verhältniswerte in den mit DMSO-behandelten Zellen jedoch in der S-Phase und im Thymidin-Block höher waren als in den asynchronen Zellen. Dadurch ergab sich trotz sehr ähnlicher Nutlin-3-induzierter Absolutwerte in den asynchronen Zellen eine Induktion um den Faktor 4,2 und in den Zellen in der S-Phase sowie mit aufrecht erhaltenem Thymidin-Block eine Induktion um den Faktor 2,2.
Zusammenfassend ließ sich festhalten, dass eine Induktion des Gens *PUMA* durch die Inkubation mit Nutlin-3 auf mRNA-Ebene sowohl in asynchronen Zellen als auch während der S-Phase möglich war.

3.6.2 Die Behandlung mit Nutlin-3 während der S-Phase induziert schwach die Expression des p53-responsiven Gens *PCNA* auf mRNA-Ebene in U2OS-Zellen

Ein weiteres p53-responsives Gen ist *PCNA* (*proliferating cell nuclear antigen*), dessen Produkt eine wichtige Rolle bei der Replikation von DNA spielt (siehe Kapitel 1.1.2.2). Insbesondere aufgrund dieser Funktion sollte untersucht werden, ob durch die Behandlung mit Nutlin-3 während der S-Phase die Induktion von *PCNA* möglich ist. Da in einem vorherigen Versuch bereits gezeigt wurde, dass die Aktivierung von p53 während der S-Phase die Replikation nicht verhindert, jedoch einen Einfluss auf die Replikationsrate hat, wäre *PCNA* im Fall einer Induzierbarkeit möglicherweise ein Kandidat, dem eine Beteiligung an dieser Beobachtung zukommen könnte.
Die qPCR wurde mit spezifischen Primern für *36B4* sowie für *PCNA* durchgeführt. Anschließend wurden die Werte auf die *36B4*-Expression normiert. Das Ergebnis dieses Experiments ist in **Abbildung 8 B** dargestellt.
In allen drei behandelten Gruppen zeigte sich eine schwache Induktion der Genexpression von *PCNA* durch Inkubation mit Nutlin-3. In asynchronen Zellen handelte es sich um eine Induktion um den Faktor 1,6. In synchronisierten Zellen, die nicht aus dem Thymidin-Block entlassen wurden, ließ sich eine sehr schwache Induktion um den Faktor 1,1 feststellen. In Zellen, die sich in der S-Phase befanden, war eine Induktion um den Faktor 1,3 zu beobachten. Erneut zeigte sich ein Anstieg der basalen *PCNA*-Expression in der mit DMSO behandelten Kontrolle in den zuvor synchronisierten Zellen.

Abschließend ließ sich festhalten, dass auch das p53-responsive Gen *PCNA* in der S-Phase induzierbar war, allerdings beschränkte sich in diesem Experiment die Induzierbarkeit durch Behandlung mit Nutlin-3 in allen drei untersuchten Gruppen auf ein schwaches Ausmaß.

3.6.3 Die Behandlung mit Nutlin-3 während der S-Phase induziert die Expression des p53-responsiven Gens *14-3-3σ* (*SFN*) auf mRNA-Ebene in U2OS-Zellen

Ein weiteres bekanntes p53-responsives Genprodukt ist 14-3-3σ, das der 14-3-3-Proteinfamilie entstammt. Es existieren zahlreiche Isoformen dieser 14-3-3-Proteine, die eine breite regulatorische Funktion in der Zelle innehaben. Die Isoform 14-3-3σ ist beteiligt an der Regulation des Übergangs von der G2-Phase in die M-Phase des Zellzyklus, zudem bindet sie während der Replikation an DNA in der Nähe der Replikationsursprünge. Dies macht auch 14-3-3σ zu einem möglichen Kandidaten für eine Beteiligung an der durch p53 ausgeübten Funktion in der S-Phase. Aus diesem Grund sollte eine Induzierbarkeit in der S-Phase durch Behandlung mit Nutlin-3 untersucht werden.

Die qPCR zur Bestimmung der Genexpressionswerte erfolgte mit spezifischen Primern für *36B4* sowie für *14-3-3σ* (*SFN*). Die erhaltenen Werte für *14-3-3σ* wurden zuletzt auf die Genexpressionswerte für *36B4* normiert. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in **Abbildung 8 C** dargestellt.

Wie in den bisher durchgeführten Versuchen zur Induzierbarkeit anderer p53-responsiver Gene zeigte sich auch für *14-3-3σ* in allen drei Behandlungsgruppen eine Induktion der Genexpression durch die Inkubation mit Nutlin-3. Auch hier zeigte sich im Vergleich zu asynchronen Zellen ein Anstieg in der basalen Expression von *14-3-3σ* in der mit DMSO behandelten Kontrolle in den Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Behandlung in der S-Phase befanden, während die Expressionswerte der Nutlin-3-behandelten Zellen in beiden Fällen bei etwa 0,17 lagen und sich somit nicht wesentlich unterschieden. Ein Anstieg der basalen Expression fand sich dieses Mal jedoch nicht in den im Thymidin-Block belassenen Zellen. Insgesamt ergab sich somit in den asynchronen Zellen eine Induktion der Genexpression um den Faktor 1,9, in den im Thymidin-Block belassenen Zellen eine Induktion um den Faktor 1,6 sowie in den sich in der S-Phase befindenden Zellen eine Induktion um den Faktor 1,3. Zusammenfassend ließ sich also festhalten, dass auch *14-3-3σ* in U2OS-Zellen während der S-Phase durch die Inkubation mit Nutlin-3 und eine somit einhergehende Akkumulation von p53 induziert werden konnte.

3.6.4 Die Behandlung mit Nutlin-3 während der S-Phase induziert die Expression des p53-responsiven Gens *p53R2* (*RRM2B*) auf mRNA-Ebene in U2OS-Zellen

Auch die Ribonukleotidreduktase p53R2 ist ein Ziel des Transkriptionsfaktors p53 (siehe Kapitel 1.1.2.2). Durch ihre Funktion stellt sie dNTPs während der Replikation bereit und ist somit ein wichtiger potentieller Kandidat, über den p53 Einfluss auf die DNA-Replikation in der S-Phase nehmen könnte. Auch für *p53R2* (*RRM2B*) sollte deshalb eine Induzierbarkeit durch die Behandlung mit Nutlin-3 während der S-Phase untersucht werden.

Die qRT-PCR zur Bestimmung der Genexpressionswerte erfolgte mit spezifischen Primern für das konstitutiv exprimierte Haushaltsgen *36B4* sowie für *p53R2*. Die erhaltenen Werte für *p53R2* wurden zuletzt auf die Genexpressionswerte für *36B4* normiert. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in **Abbildung 8 D** dargestellt.

In Übereinstimmung mit den bisher durchgeführten Experimenten zeigte sich auch für *p53R2* eine gut sichtbare Induzierbarkeit durch die Behandlung mit Nutlin-3 in allen drei untersuchten Konditionen. Ein Anstieg der basalen Genexpression von *p53R2* in der mit DMSO behandelten Negativkontrolle war im vorliegenden Experiment nur in den Zellen zu beobachten, die sich in der S-Phase befanden. Es ergab sich für die Gruppe asynchroner Zellen eine Induzierbarkeit der Genexpression von *p53R2* um den Faktor 2,3. In der Gruppe, die im Thymidin-Block belassen wurde, lag eine Induktion um den Faktor 3,4 vor. Obwohl in den Zellen in der S-Phase der Absolutwert der durch Nutlin-3 induzierten Genexpression von *p53R2* der höchste im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen war, ergab sich bedingt durch die ebenfalls erhöhte basale Expression in der mit DMSO behandelten Kontrolle eine Induktion um den Faktor 1,8.

Insgesamt ließ sich also zusammenfassen, dass auch die Ribonukleotidreduktase p53R2 in der S-Phase durch Behandlung mit Nutlin-3 induzierbar ist. Es wurde nun also in mehreren Experimenten gezeigt, dass eine Akkumulation des Tumorsuppressors p53 auch in der S-Phase stattfand und dass dieser ebenfalls in der Lage war, einige bekannte Zielgene zu induzieren. Die Induktion von *p21*, *PUMA*, *PCNA*, *14-3-3σ* und *p53R2* konnte auf mRNA-Ebene beobachtet werden, eine Akkumulation von p21 auf Proteinebene wurde ebenso gezeigt. In weiteren Versuchen sollten diese Beobachtungen in ihrer Tendenz bestätigt werden. Um eine möglichst umfassende Charakterisierung der Funktion von p53 in der S-Phase erreichen zu können, war eine weitere Zielsetzung daher, die Induzierbarkeit weiterer Gene durch p53 zu untersuchen.

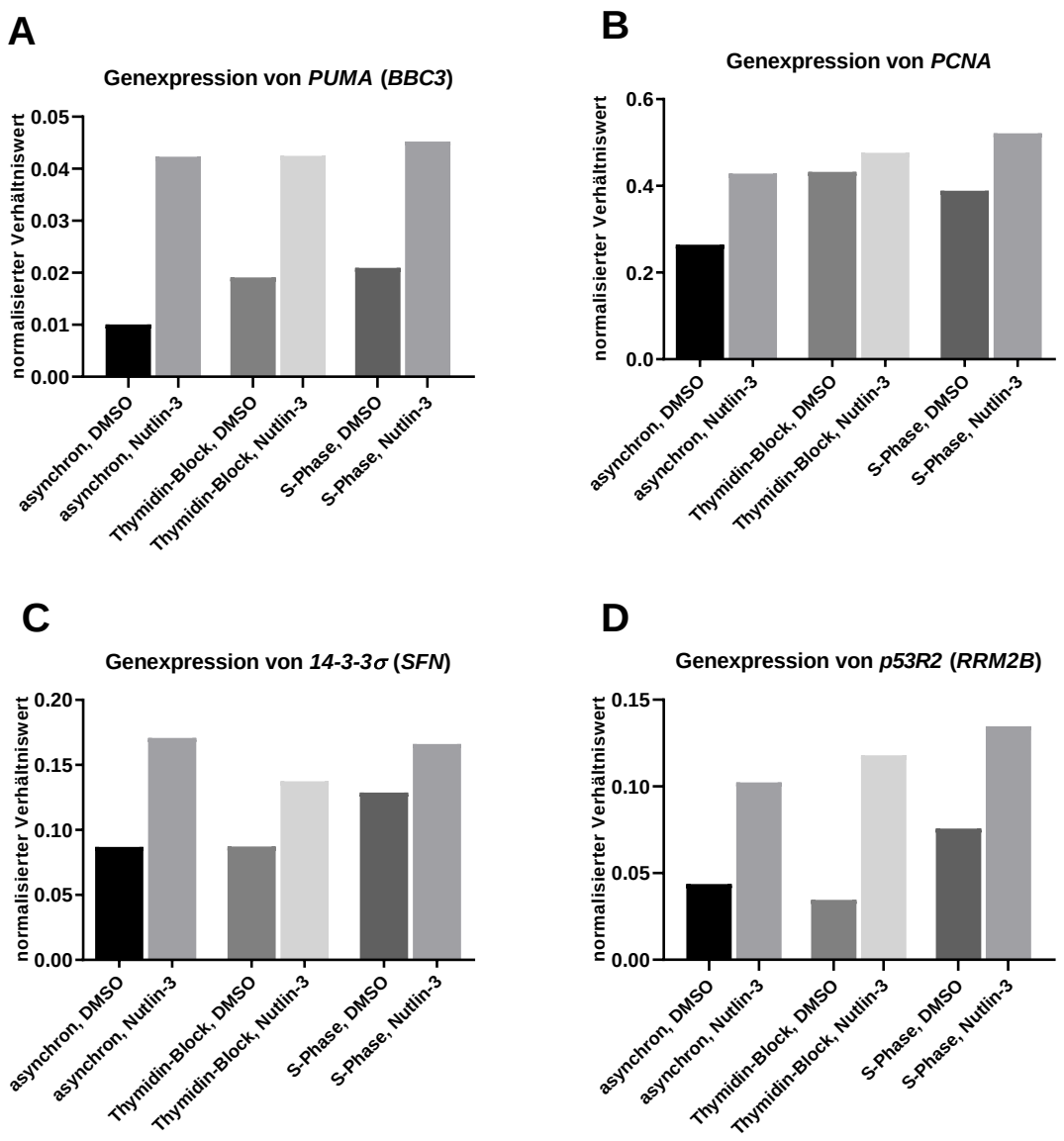

Abbildung 8: Nutlin-3-Behandlung von asynchronen und synchronisierten, sich bereits in der S-Phase befindenden U2OS-Zellen: Genexpression wichtiger p53-responsiver Gene

Zwei Gruppen von U2OS-Zellen wurden zunächst mithilfe eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert (siehe 2.2.1.6). In einer der Gruppen wurde der zweite Thymidin-Block durch erneutes dreimaliges Waschen mit Kulturmedium aufgehoben und der Eintritt in die S-Phase somit ermöglicht (S-Phase), in der anderen Gruppe wurde das Thymidin im Kulturmedium belassen und der Block somit nicht aufgehoben (Thymidin-Block). Eine Gruppe asynchroner Zellen (asynchron) diente zudem dem Vergleich der Nutlin-3-Wirkung auf asynchrone Zellen mit der Wirkung auf Zellen in der S-Phase. 2,5 h nach der Aufhebung des Thymidin-Blocks wurden Zellen aller Gruppen zeitgleich mit 10 µM Nutlin-3 behandelt und für 5,5 h inkubiert. Da Nutlin-3 in DMSO gelöst ist, diente die Behandlung mit DMSO als Negativkontrolle.
Im Anschluss an die Behandlung erfolgte die Isolation der RNA, eine reverse Transkription sowie jeweils eine qPCR mit spezifischen Primern für die p53-responsiven Gene *PUMA*, *PCNA*, *14-3-3σ* und *p53R2*. Gezeigt ist die Genexpression jeweils in Form eines Verhältniswertes, der auf die Expression des konstitutiv exprimierten Haushaltsgens *36B4* normiert ist.

3.7 Eine Prä-Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin-3 während der letzten Stunden eines Thymidin-Blocks verhindert nicht das anschließende Eintreten der Zellen in die S-Phase

In vorangegangenen Experimenten (siehe 3.3) ließ sich bereits zeigen, dass die Inkubation mit Nutlin-3 während der S-Phase deren Voranschreiten nicht unterbindet. Es zeigte sich jedoch ein Effekt auf die Replikationsrate, die in Nutlin-3-behandelten Zellen geringer war als die der mit DMSO behandelten Kontrolle. Dem Protokoll dieses Experiments folgend wurden die Zellen nach Aufhebung des zweiten Thymidin-Blocks zunächst für 2,5 h mit Zellkulturmedium inkubiert, um ein Eintreten des Großteils der synchronisierten Zellen in die S-Phase zu gewährleisten. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit Nutlin-3 für weitere 5,5 h, um die Transkription p53-responsiver Gene zu ermöglichen. Insgesamt erfolgten die Lyse der Zellen und die Isolation ihrer RNA also zu einem Zeitpunkt von 8 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks. Auf Grundlage von durch Priyanka Saini im selben Labor angefertigten Analysen zum zeitlichen Ablauf der S-Phase in U2OS-Zellen nach Anwendung eines doppelten Thymidin-Blocks wurde durch diese mündlich bestätigt, dass sich die Zellen 8 h nach Aufhebung des zweiten Thymidin-Blocks bereits in einem späten Stadium der S-Phase befinden. Es würde jedoch in dem verwendeten Modellsystem zur Charakterisierung der Funktion des Tumorsuppressors p53 in der S-Phase eine deutliche Einschränkung der Aussagekraft zur Folge haben, wenn eine Analyse aufgrund der Gegebenheiten des Protokolls einzig zu einem Zeitpunkt in der späten S-Phase möglich wäre und weitere Stadien der S-Phase außer Acht gelassen würden. Somit war dringend anzustreben, das vorliegende und bisher verwendete Protokoll nun anzupassen, um eine Betrachtung auch früherer Stadien der S-Phase zu realisieren, in denen dennoch bereits hohe Spiegel an freiem und aktivem p53 in der Zelle vorliegen sollten. Eine Möglichkeit war die Prä-Inkubation der U2OS-Zellen mit Nutlin-3 in den letzten Stunden des Thymidin-Blocks. Mit dieser sollten hohe p53-Spiegel bereits zum Eintritt in die S-Phase vorliegen. Es war jedoch unklar, ob ein Eintritt in die S-Phase unter diesen Bedingungen überhaupt erfolgen würde. Dies sollte in einem Experiment untersucht werden. Zur Bestimmung einer adäquaten Zeitdauer für eine Prä-Inkubation mit Nutlin-3 wurden folgende Überlegungen angestellt: In dieser Zeit sollte idealerweise genug aktives p53 akkumuliert sein, um zeitnah nach dem Eintritt in die S-Phase zu messbaren Effekten führen zu können. Jedoch sollte die Prä-Inkubationszeit so kurz sein, dass ein relevantes Ausmaß an Induktion p53-responsiver Gene vor dem Beginn der S-Phase noch nicht stattfinden würde. Somit wäre es möglich, eine p-53-mediierte Gen-induktion während der

frühen und mittleren S-Phase zu untersuchen. Aus diesen Überlegungen heraus wurde eine Prä-Inkubationszeit von 4 h gewählt.

Zur Durchführung des Experiments wurden wie bisher zunächst zwei Gruppen von U2OS-Zellen mittels eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert. Während der letzten vier Stunden des zweiten Blocks wurde dem thymidinhaltigen Zellkulturmedium zusätzlich Nutlin-3 zu einer Endkonzentration von 10 µM zugesetzt. Als Negativkontrolle wurden zudem einige Zellen mit DMSO behandelt, dem Lösungsmittel des Nutlins.

Eine Gruppe von synchronisierten Zellen wurde nach Ablauf dieser vierstündigen Prä-Inkubationszeit durch viermaliges Waschen mit PBS aus dem Thymidin-Block entlassen; in der anderen Gruppe wurde zum Zweck einer Negativkontrolle für die S-Phase das Thymidin im Kulturmedium belassen und der Block somit nicht aufgehoben. Anschließend wurden beide Gruppen für weitere vier Stunden mit Nutlin-3 beziehungsweise DMSO inkubiert. Zur Verbesserung der Verständlichkeit des Protokolls wurde der Zeitpunkt der Aufhebung des Thymidin-Blocks als Zeitpunkt 0 und somit Startpunkt des eigentlichen Experiments betrachtet. Im Folgenden verstehen sich also alle genannten Zeitpunkte als „Zeit nach Aufhebung des Thymidin-Blocks“, auch in der synchronisierten Gruppe, in der dieser nicht aufgehoben wurde. In den jeweils letzten zwei Stunden der Inkubationszeit mit Nutlin-3 wurde EdU zu einer Endkonzentration von 10 µM dem Kulturmedium hinzugefügt. Dieses wurde im Rahmen der DNA-Replikation in die neu synthetisierte DNA inkorporiert.

Anschließend wurden alle Zellen trypsinisiert und mit einer formaldehydhaltigen Lösung fixiert. Nach ebenfalls erfolgter Permeabilisierung konnte das inkorporierte EdU in einer Click-Reaktion an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 647 gekoppelt werden. Die Gesamt-DNA der Zellen wurde mit Propidiumiodid (PI) markiert. Mithilfe einer FACS-Analyse konnten dann für jede Zelle der Gesamt-DNA-Gehalt und der Gehalt an inkorporiertem EdU als Maß für die erfolgte DNA-Replikation bestimmt werden. Das Ergebnis dieses Experiments ist in **Abbildung 9** dargestellt.

Es zeigte sich zunächst, dass in der Gruppe von Zellen, die nicht aus dem Thymidin-Block entlassen wurde, der Gesamt-DNA-Gehalt zu einem überwiegenden Teil dem einer Zelle vor der S-Phase entsprach. Die Anwendung eines doppelten Thymidin-Blocks erwies sich also auch in diesem Experiment als wirksam. In dieser Gruppe wurde zudem nur eine minimale Alexa-Fluor-Intensität detektiert, entsprechend einer minimalen EdU-Inkorporation, wie aufgrund der bereits zuvor erwähnten Kompetition zwischen EdU und Thymidin zu erwarten war.

In der Gruppe von Zellen, die aus dem Thymidin-Block in die S-Phase entlassen wurden, zeigte sich kein Unterschied zwischen einer Behandlung mit Nutlin-3 und der entsprechenden Kontrollbehandlung mit DMSO. In beiden Gruppen entsprach der Gesamt-DNA-Gehalt zu einem überwiegenden Teil dem einer Zelle in der S-Phase, zwischen G1 und G2. Bei exakter Ausrichtung der Histogramme untereinander lag der jeweilige Peak für die S-Phase auf einer Linie, die in der Abbildung zur Veranschaulichung eingezeichnet wurde. Es ließ sich somit darauf schließen, dass zu einem Zeitpunkt von 4 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks beide Behandlungsgruppen einen annähernd gleichen DNA-Gehalt aufwiesen. Auch die Betrachtung der Alexa-Fluor-Intensität, aufgetragen gegen den Gesamt-DNA-Gehalt, ließ keine wesentlichen Unterschiede erkennen. Von den mit DMSO behandelten Zellen inkorporierten im Mittel 78% EdU (Gate P4; Standardabweichung 0,8), von den mit Nutlin-3 behandelten Zellen im Mittel 76,45% (Gate P4; Standardabweichung 2,35). Es war also davon auszugehen, dass annähernd gleich viele Zellen beider Gruppen EdU inkorporierten, demzufolge also DNA replizierten.

Zusammenfassend ließ sich festhalten, dass auch durch eine vierstündige Prä-Inkubation der U2OS-Zellen mit Nutlin-3 der Eintritt in die S-Phase und die DNA-Replikation nicht verhindert wurde. Eine Prä-Inkubationszeit von vier Stunden erschien also geeignet für die Verbesserung des Protokolls, um im Modellsystem für die vorliegende Arbeit verschiedene Zeitpunkte im Verlauf der S-Phase betrachten zu können. Die vorliegenden Ergebnisse legten nahe, dass das Vorhandensein hoher Spiegel von p53 weder einen Einfluss auf den Gesamt-DNA-Gehalt der Zellen zum Zeitpunkt 4 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks noch auf die Anzahl der replizierenden Zellen hat. Über das Ausmaß der EdU-Inkorporation der einzelnen Zelle ließ sich mit den vorhandenen Daten jedoch keine Aussage treffen. Es blieb also weiterhin zu evaluieren, wie sich eine Inkubation mit Nutlin-3 auf die Replikationsrate einzelner Zellen auswirkt.

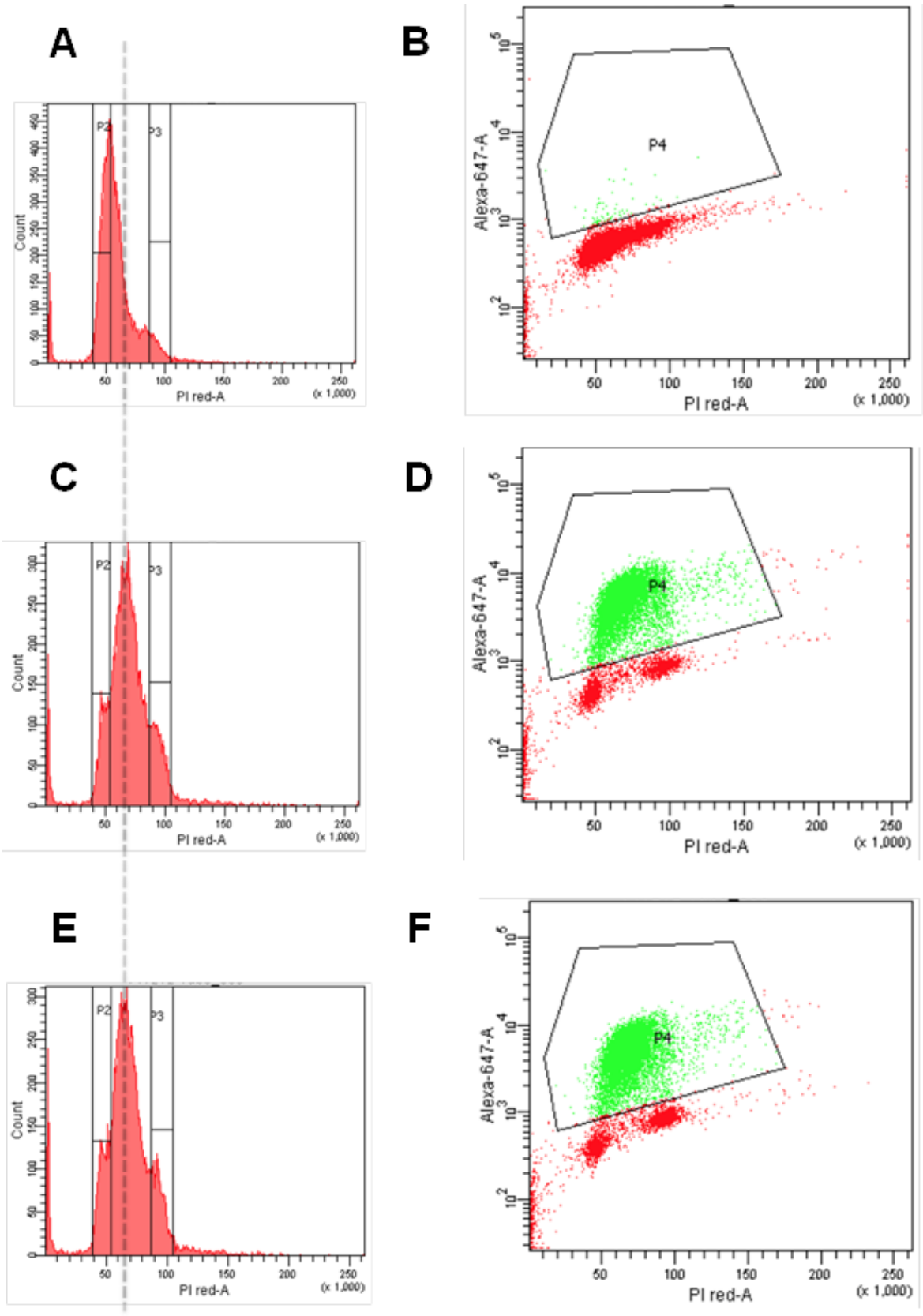

Abbildung 9: Einfluss einer Prä-Inkubation mit Nutlin-3 auf die S-Phase in U2OS-Zellen: FACS-Analyse zur Bestimmung der Replikationstätigkeit

U2OS-Zellen wurden zunächst mithilfe eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert (siehe Kapitel 2.2.1.6). In den letzten vier Stunden dieses zweiten Thymidin-Blocks wurde im Sinne einer Prä-Inkubation Nutlin-3 in einer Endkonzentration von 10 µM in das Kulturmedium eingebracht. Da Nutlin-3 in DMSO

gelöst ist, diente die Behandlung einiger Zellen mit DMSO als Negativkontrolle. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen aus dem Thymidin-Block durch viermaliges Waschen mit PBS entlassen (**C, D, E und F**). In der anderen Gruppe wurde das Thymidin im Kulturmedium belassen (**A und B**) und der Block somit nicht aufgehoben. Dies diente als Negativkontrolle für die S-Phase. In beiden Gruppen erfolgte eine weitere Inkubation mit 10 µM Nutlin-3 bzw. DMSO für 4 h. Nach 2 h wurde zu beiden Versuchsansätzen EdU in einer Endkonzentration von 10 µM hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert, in Suspension gebracht und mit einer paraformaldehydhaltigen Lösung fixiert. Nach Kopplung des EdU mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 647 erfolgte die Zugabe von Propidiumiodid zur Anfärbung der Gesamt-DNA und die durchflusszytometrische Messung.
Gezeigt ist in **A , C und E** ein Histogramm des Gesamt-DNA-Gehalts, dargestellt durch die Intensität von PI *red*.
In **B, D und F** ist der EdU-Gehalt (dargestellt durch die Intensität von Alexa Fluor 647, hier grün) gegen den Gesamt-DNA-Gehalt (dargestellt durch die Intensität von PI *red*, hier rot) aufgetragen.

A und B: Keine Aufhebung des zweiten Thymidin-Blocks: Nach der zweiten 17-stündigen Inkubationsphase mit 2 mM Thymidin wurde dieses im Kulturmedium belassen und nicht durch Waschen entfernt.

C und D: Aufhebung des zweiten Thymidin-Blocks und Behandlung mit DMSO: Nach der zweiten 17-stündigen Inkubationsphase mit 2 mM Thymidin wurde dieses durch viermaliges Waschen mit PBS entfernt und anschließend frisches Zellkulturmedium eingesetzt. Die vierstündige Prä-Inkubation mit DMSO während des Thymidin-Blocks wurde nach dessen Aufhebung durch eine Inkubation für weitere 4 h fortgesetzt.

E und F: Aufhebung des zweiten Thymidin-Blocks und Behandlung mit Nutlin-3: Nach der zweiten 17-stündigen Inkubationsphase mit 2 mM Thymidin wurde dieses durch viermaliges Waschen mit PBS entfernt und anschließend frisches Zellkulturmedium eingesetzt. Die vierstündige Prä-Inkubation mit Nutlin-3 während des Thymidin-Blocks wurde nach dessen Aufhebung durch eine Inkubation für weitere 4 h fortgesetzt.

3.8 Die Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin-3 hat einen Einfluss auf die Replikationsrate der einzelnen Zellen in verschiedenen Abschnitten der S-Phase

In Kapitel 3.3 konnte ein Einfluss von p53 auf die Replikationsrate gezeigt werden. Es war zu beobachten, dass die Inkorporation von EdU während eines bestimmten Zeitabschnitts der S-Phase in U2OS-Zellen, die mit Nutlin-3 inkubiert wurden und dadurch hohe p53-Spiegel aufwiesen, signifikant geringer war als die einer mit DMSO inkubierten Negativkontrolle. Es handelte sich hierbei um den Zeitabschnitt von sechs bis acht Stunden nach Aufhebung eines zur Synchronisation verwendeten Thymidin-Blocks. Die Inkubation mit Nutlin-3 wurde jedoch erst 2,5 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks begonnen. Nun konnte in Kapitel 3.7 auch gezeigt werden, dass eine Prä-Inkubation mit Nutlin-3 während der letzten vier Stunden des zweiten Thymidin-Blocks den Eintritt der Zellen in die S-Phase zulässt und keinen negativen Einfluss auf die Anzahl der replizierenden Zellen hat. Eine Funktionsfähigkeit von p53 auch während des Thymidin-Blocks wurde durch verschiedene Untersuchungen zur Induzierbarkeit p53-responsiver Gene gezeigt. Somit

konnte davon ausgegangen werden, dass zum Beginn der S-Phase bereits erhöhte Spiegel von p53 in der Zelle vorlagen. Es sollte also durch eine solche Prä-Inkubation möglich sein, den Einfluss von p53 auf die Replikationsraten abschnittweise im gesamten Verlauf der S-Phase zu erfassen. Aufgrund des zeitlich sehr streng vorgegebenen Protokolls und der daraus resultierenden Unmöglichkeit der abschnittweisen Erfassung einer kompletten S-Phase in einem einzigen Experiment wurde dabei in mehreren Einzelversuchen vorgegangen.

3.8.1 Die Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin-3 verringert die Replikationsrate der einzelnen Zellen zu den Zeitpunkten 4, 6 und 8 h nach Aufhebung eines doppelten Thymidin-Blocks

Um sich einen ersten Überblick über den Verlauf der S-Phase mit hohen p53-Spiegeln verschaffen zu können, wurden zunächst die Zeitpunkte 4, 6 und 8 h nach Auf-hebung des Thymidin-Blocks gewählt. Es sei darauf hingewiesen, dass es sich bei den angegebenen Zeitpunkten jeweils um den Endzeitpunkt einer zweistündigen EdU-Inkubationszeit handelt – das jeweilige Experiment erfasst somit die letzten zwei Stunden der angegebenen Zeiten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird dennoch jede dieser Zeitspannen im Folgenden und in allen Grafiken nach ihrem Endpunkt benannt. Als Orientierungshilfe dient Tabelle 36.

Tabelle 36: Verwendete Bezeichnungen für untersuchte Zeitabschnitte der S-Phase

Im Text und in Grafiken verwendete Bezeichnung des Endzeitpunktes	**Darin eingeschlossene Zeitspanne**
2 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks (AdTB)	0-2 h nach AdTB
3 h nach AdTB	1-3 h nach AdTB
4 h nach AdTB	2-4 h nach AdTB
5 h nach AdTB	3-5 h nach AdTB
6 h nach AdTB	4-6 h nah AdTB
8 h nach AdTB	6-8 h nach AdTB
10 h nach AdTB	8-10 h nach AdTB
12 h nach AdTB	10-12 h nach AdTB

Zunächst wurden wie zu Beginn jedes Versuchs U2OS-Zellen mithilfe eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert. Während der letzten 4 h des Blocks erfolgte eine Prä-Inkubation mit Nutlin-3 in einer Konzentration von 10 µM. Da dieses in DMSO gelöst ist, diente die Behandlung mit DMSO als Negativkontrolle. Auch eine Gruppe asynchroner Zellen wurde zeitgleich mit Nutlin-3 und DMSO prä-inkubiert. Diese Gruppe diente als Kontrolle, um den Einfluss der unterschiedlich langen Nutlin-3-Inkubationsdauer in den verschiedenen Zeitabschnitten vergleichen zu können. Der zweite Thymidin-Block wurde durch dreimaliges Waschen der Zellen mit Kulturmedium aufgehoben und danach die Inkubation mit Nutlin-3 beziehungsweise DMSO fortgesetzt. Diese erfolgte für weitere 4, 6 und 8 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks und analog in den asynchronen Zellen. In den jeweils letzten zwei Stunden dieser verschiedenen Inkubationszeiten wurde dem Kulturmedium EdU zu einer Endkonzentration von 10 µM hinzugefügt, das im Rahmen der Replikation sodann in die neu synthetisierte DNA eingebaut wurde. Für jeden untersuchten Zeitpunkt gab es zudem eine EdU-Negativkontrolle.

Am Ende dieser 4, 6 und 8 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks wurden Zellen jeder Versuchsgruppe mittels einer formaldehydhaltigen Lösung fixiert und anschließend permeabilisiert. Es erfolgte in einer Click-Reaktion eine Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffs Alexa Fluor 488 an das inkorporierte EdU. Die Gesamt-DNA der Zellen wurde durch Markierung mit Hoechst 33342 sichtbar gemacht, um dem Mikroskop eine Detektion aller Zellkerne zu ermöglichen. Im BD Pathway Mikroskop wurden alle Zellkerne erfasst und deren jeweilige Alexa-Fluor-Intensität gemessen, die als Maß für die Replikationstätigkeit dient. In einem Boxplot wurden die Intensitäten der einzelnen Zellen einer Behandlungsgruppe aufgetragen. Das Ergebnis ist in **Abbildung 10 A** und **B** dargestellt. Zudem wurden die 25. Perzentile, der Median sowie die 75. Perzentile der Alexa-Fluor-Intensität in Nutlin-3-behandelten und DMSO-behandelten Zellen im beobachteten Verlauf der S-Phase aufgetragen. Das Ergebnis ist in **Abbildung 10 C** dargestellt.

Es war zunächst festzustellen, dass in allen synchronisierten Behandlungsgruppen Zellen in deutlich höherem Maße EdU inkorporierten als in ihren asynchronen Kontrollgruppen. Somit konnte eine zweckmäßige Anwendung des doppelten Thymidin-Blocks angenommen und davon ausgegangen werden, dass sich die synchronisierten Zellen in der S-Phase befanden. Verglich man nun die einzelnen Zeitpunkte nach Aufhebung des Thymidin-Blocks untereinander, war in den synchronisierten und mit DMSO behandelten Zellen ein hochsignifikanter Anstieg der medianen Alexa-Fluor-Intensität vom Zeitpunkt 4 h bis 6 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks zu beobachten. Nachfolgend ließ sich

von 6 h bis 8 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks eine hochsignifikante Abnahme der medianen Alexa-Fluor-Intensität feststellen.
In den mit Nutlin-3 behandelten synchronisierten Zellen war eine solche Veränderung der medianen Alexa-Fluor-Intensität über die betrachtete Zeit nicht zu beobachten. Es bestanden keine annähernd so stark ausgeprägten Unterschiede zwischen den gemessenen Intensitäten zu den Zeitpunkten 4 h, 6 h und 8 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks. Während in den asynchronen mit DMSO behandelten Zellen die medianen Werte der Alexa Fluor Intensität annähernd stabil blieben, zeigte sich in den mit Nutlin-3 behandelten Zellen dieser asynchronen Gruppe ein negativer Einfluss der Behandlungsdauer auf die Inkorporation von EdU.

In **Abbildung 10 C** sind als Kennwerte der Verteilung die 25. und 75. Perzentile sowie der Median der Alexa-Fluor-Intensität innerhalb der synchronisierten Zellen nach Korrektur des Hintergrundes aufgetragen. Wie bereits beobachtet, zeigte auch in dieser Darstellung die mediane Intensität der mit DMSO behandelten Zellen zunächst einen Anstieg und darauffolgend einen Abfall, während die mediane Intensität der mit Nutlin-3 behandelten Zellen über die betrachtete Zeit insgesamt nur geringfügig variierte. Bei Betrachtung der 25. sowie 75. Perzentile ließ sich für die mit DMSO behandelten Zellen ebenfalls zunächst ein Anstieg der Alexa-Fluor-Intensität und darauffolgend eine Abnahme ebendieser feststellen. Über die Zeit kam es im Fall der 25. Perzentile insgesamt zu einem Abfall, im Fall der 75. Perzentile insgesamt zu einem Anstieg der Alexa-Fluor-Intensität. Bei Betrachtung der mit Nutlin-3 behandelten Zellen zeigte die mediane Intensität zwischen den Zeitpunkten 4 h und 6 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks zunächst einen sehr geringgradigen Abfall, von 6 h bis 8 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks einen wiederum sehr geringgradigen Anstieg, sodass sich über die Zeit eine annähernd stabil bleibende Intensität ablesen ließ. Die 25. Perzentile der mit Nutlin-3 behandelten Zellen zeigte über die Zeit einen kontinuierlichen Intensitätsabfall; die Intensität der 75. Perzentile nahm mäßiggradig zu. Insgesamt lagen die Intensitätswerte der mit Nutlin-3 behandelten Zellen zu allen betrachteten Zeitpunkten unter den jeweilig entsprechenden Werten der mit DMSO behandelten Zellen.

Zusammenfassend ließ sich also festhalten, dass in Übereinstimmung mit einem vorigen Experiment auch nach einer Prä-Inkubation mit Nutlin-3 während der letzten 4 h des Thymidin-Blocks im Anschluss an dessen Aufhebung ein Durchlaufen der S-Phase im betrachteten Zeitraum erfolgte. Anders als in Experimenten mit asynchronen Zellen zeigte sich in den Zellen in der S-Phase kein negativer Einfluss der zunehmenden Behandlungsdauer mit Nutlin-3 auf die mediane Alexa-Fluor-Intensität; diese zeigte in den betrachteten

Abschnitten der S-Phase einen weitgehend stabilen Verlauf. Das Vorhandensein hoher p53-Spiegel schien also die begonnene Replikation nicht negativ zu beeinflussen, die Inkorporation von EdU erfolgte nahezu konstant. Anders verhielt sich die mediane Intensität in den synchronen mit DMSO behandelten Zellen; hier konnte im Verlauf zunächst ein Anstieg und nachfolgend eine Abnahme festgestellt werden. Übereinstimmend mit bisherigen Experimenten zeigte sich während der S-Phase auch in diesem Versuch eine geringere EdU-Inkorporation im Sinne einer geringeren Replikationstätigkeit in den mit Nutlin-3 behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Es waren im vorliegenden Versuch allerdings weder der Beginn der Replikation während der S-Phase noch der Endpunkt auszumachen. In weiteren Versuchen sollte nun untersucht werden, wie sich die Replikation unter der Behandlung mit Nutlin-3 zu weiteren Zeitpunkten der S-Phase verhält. Es war zu klären, ob sich auch zu anderen Zeitpunkten ein unterschiedliches Muster im Verlauf der Replikationstätigkeit ergibt und wie zu diesen Zeitpunkten die Replikationstätigkeit durch eine Behandlung mit Nutlin-3 beeinflusst wird.

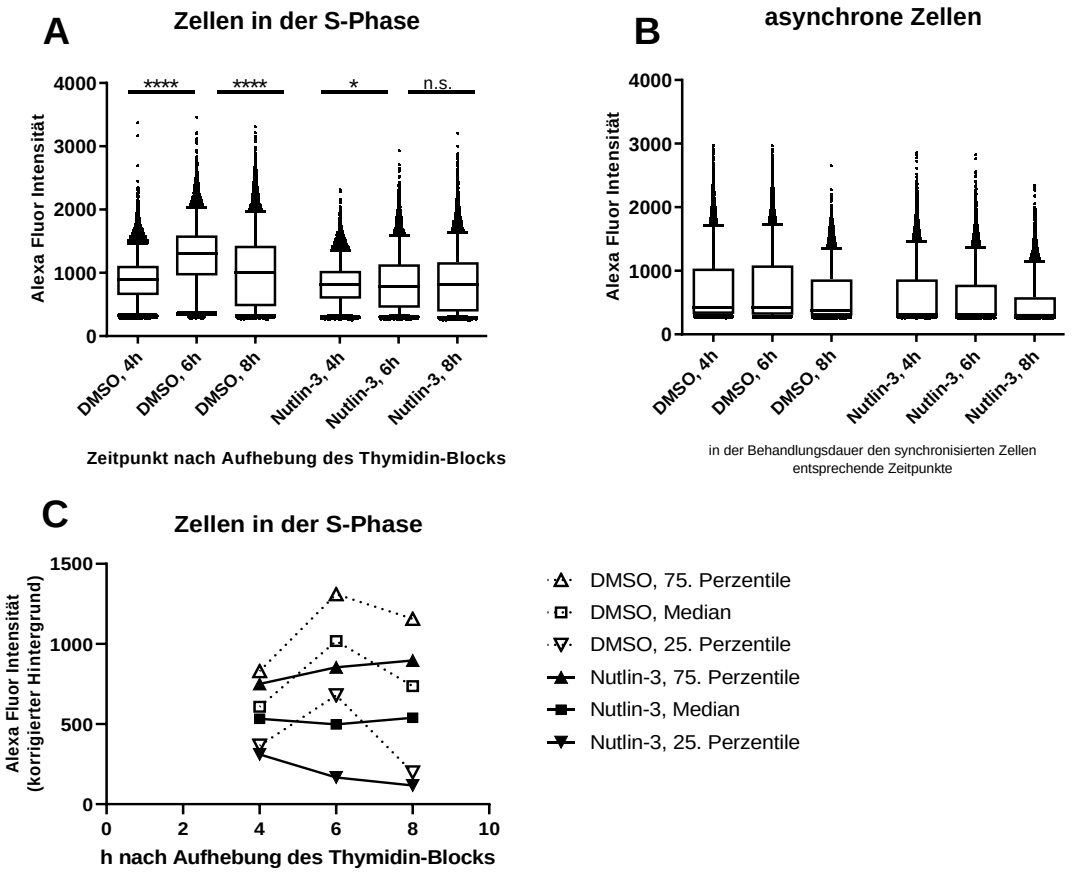

Abbildung 10: Einfluss einer Prä-Inkubation mit Nutlin-3 und anschließend für 4,6 und 8 h weitergeführter Inkubation auf die Replikation im Verlauf der S-Phase und in asynchronen Zellen

Eine Gruppe von U2OS-Zellen wurde zunächst mithilfe eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert (siehe 2.2.1.6). Während der letzten 4 h des zweiten Thymidin-Blocks erfolgte eine Prä-Inkubation mit Nutlin-3 in einer Konzentration von 10 µM. Danach wurde der zweite Thymidin-Block durch erneutes dreimaliges Waschen mit Kulturmedium aufgehoben und der Eintritt in die S-Phase somit ermöglicht. Es wurde jedoch weiterhin mit 10 µM Nutlin-3 für verschiedene Zeitspannen inkubiert. Eine Gruppe asynchroner Zellen diente zudem dem Vergleich der Nutlin-3-Wirkung auf asynchrone Zellen mit der Wirkung auf Zellen in der S-Phase. Diese Gruppe wurde jeweils analog zur synchronisierten Gruppe zeitgleich mit Nutlin-3 präinkubiert beziehungsweise inkubiert. Da Nutlin-3 in DMSO gelöst ist, diente die Behandlung einiger Zellen jeder Gruppe mit DMSO als Negativkontrolle. In den letzten 2 h dieser Inkubation wurde EdU in einer Konzentration von 10 µM zum Kulturmedium hinzugefügt. Anschließend wurden alle Zellen mithilfe einer formaldehydhaltigen Lösung fixiert und das EdU an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 gekoppelt. Die Gesamt-DNA wurde mit Hoechst 33342 angefärbt, um alle Zellkerne zu markieren. Die Erfassung der jeweiligen emittierten Lichtsignale erfolgte mithilfe des BD Pathway Mikroskops. Pro dargestellter Gruppe wurden mindestens 11.379 und maximal 28.277 Zellen erfasst.

A + B: Verteilung der Alexa-Fluor-Intensitäten der einzelnen Zellen innerhalb einer Behandlungsgruppe: Die Box wird nach unten begrenzt durch die 25. Perzentile, nach oben durch die 75. Perzentile. Der Balken innerhalb der Box zeigt die Position des Medians. Die Whisker werden nach unten begrenzt durch die 5. Perzentile und nach oben durch die 95. Perzentile. Ausreißer, die außerhalb der 5. bis 95. Perzentile liegen, werden als einzelne Punkte dargestellt.

C: Kennwerte der Verteilung der Alexa-Fluor-Intensität im Verlauf der S-Phase: Mithilfe einer EdU-Negativkontrolle zu jedem der untersuchten Zeitpunkte konnte der Hintergrund korrigiert werden.

3.8.2 Die Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin-3 verringert die Replikationsrate der einzelnen Zellen zum Zeitpunkt 2 h nach Aufhebung eines doppelten Thymidin-Blocks

Es konnte bereits beobachtet werden, dass während der S-Phase mit Nutlin-3 behandelte U2OS-Zellen eine geringere EdU-Inkorporation entsprechend einer geringeren Replikationstätigkeit im Vergleich zur mit DMSO behandelten Negativkontrolle zeigten. In einem weiteren Experiment sollte nun der Beginn der S-Phase zum Zeitpunkt 2 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks betrachtet werden. Fraglich war, ob die Inkubation mit Nutlin-3 einen Effekt auf den Start der Replikation hat.

Wie in 3.8.1 bereits beschrieben, wurden U2OS-Zellen dazu durch die Anwendung eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert und 4 h vor Aufhebung des zweiten Blocks mit Nutlin-3 in einer Konzentration von 10 µM prä-inkubiert. Als Negativkontrolle diente die Prä-Inkubation mit DMSO, dem Lösungsmittel des Nutlins. Analog wurden asynchrone Zellen mit Nutlin-3 beziehungsweise DMSO prä-inkubiert und im Folgenden zeitgleich mit der Gruppe der synchronisierten Zellen behandelt. Nachdem in der Gruppe der synchronisierten Zellen der zweite Thymidin-Block zum Zeitpunkt 0 aufgehoben wurde, erfolgte die Inkubation aller Zellen mit EdU in einer Konzentration von 10 µM für 2 h mit Ausnahme einer Negativkontrolle für EdU. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit einer formaldehydhaltigen Lösung. Nach Permeabilisation der Zellen wurde in einer Click-Reaktion der Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor an das inkorporierte EdU gekoppelt und die Gesamt-DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 markiert. Im BD Pathway Mikroskop wurden sodann alle Zellkerne detektiert und die jeweilige Alexa-Fluor-Intensität bestimmt. Die Verteilung der Intensität wurde nach Behandlungsgruppen in einem Boxplot aufgetragen. Das Ergebnis des Experiments zeigt **Abbildung 11**.

Zunächst konnte in der Gruppe der asynchronen Zellen eine geringfügige Alexa-Fluor-Intensität beobachtet werden, die sich zwischen den mit Nutlin-3 behandelten Zellen und der Kontrolle nicht unterschied. In den synchronisierten und aus dem Thymidin-Block entlassenen Zellen zeigte sich bei insgesamt extrem niedriger Alexa-Fluor-Intensität, die sich dem Hintergrundrauschen annäherte, ein signifikanter Unterschied zwischen der DMSO-Kontrolle und den mit Nutlin-3 behandelten Zellen, die eine niedrigere Intensität aufwiesen.

Somit bestätigte sich die bisher gemachte Beobachtung, dass während unterschiedlicher Abschnitte der S-Phase ein negativer Einfluss von Nutlin-3 auf die EdU-Inkorporation und entsprechend auf die Replikationstätigkeit besteht. Die insgesamt sehr niedrige Intensität ließ darauf schließen, dass bis zum Zeitpunkt 2 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks

noch keine wesentliche Replikationstätigkeit stattgefunden hatte, die S-Phase in U2OS-Zellen also etwa zwei Stunden nach Aufhebung des Thymidin-Blocks erst begann.

Entsprechend bisheriger Erkenntnisse zeigte sich ebenfalls, dass eine Inkubation mit Nutlin-3 für insgesamt sechs Stunden keinen signifikanten Einfluss auf die Replikationstätigkeit asynchroner Zellen hatte.

Da in dem vorliegenden Experiment der Beginn der Replikation während der S-Phase betrachtet wurde, sollte in einem folgenden Versuch nun der frühe Verlauf der S-Phase weiter beobachtet werden.

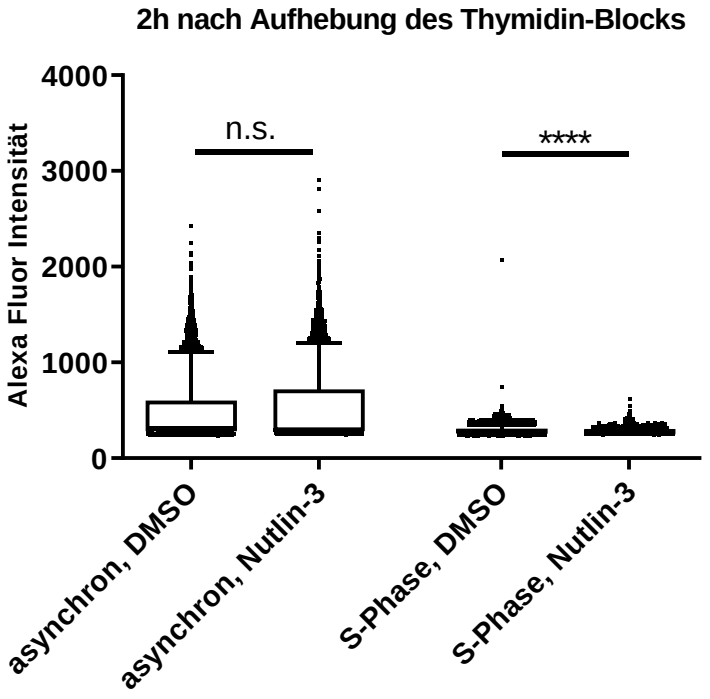

Abbildung 11: Einfluss einer Prä-Inkubation mit Nutlin-3 und anschließend für 2 h weitergeführter Inkubation auf die Replikation im Verlauf der S-Phase und in asynchronen Zellen

Verteilung der Alexa-Fluor-Intensitäten der einzelnen Zellen innerhalb einer Behandlungsgruppe: Eine Gruppe von U2OS-Zellen wurden zunächst mithilfe eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert. Dies erfolgte durch Inkubation mit Thymidin in einer Konzentration von 2 mM für 16 h, anschließendem dreifachen Waschen der Zellen mit Zellkulturmedium und Inkubation in Kulturmedium für 8 h, sowie einer weiteren Inkubation mit 2 mM Thymidin für 16 h. Während der letzten 4 h dieses zweiten Thymidin-Blocks erfolgte eine Prä-Inkubation mit Nutlin-3 in einer Konzentration von 10 µM. Danach wurde der zweite Thymidin-Block durch erneutes dreimaliges Waschen mit Kulturmedium aufgehoben und der Eintritt in die S-Phase somit ermöglicht. Es wurde noch für weitere 2 h mit 10 µM Nutlin-3 inkubiert. Eine Gruppe asynchroner Zellen diente zudem dem Vergleich der Nutlin-3-Wirkung auf asynchrone Zellen mit der Wirkung auf Zellen in der S-Phase. Diese Gruppe wurde jeweils analog zur synchronisierten Gruppe zeitgleich mit Nutlin-3 prä-inkubiert beziehungsweise inkubiert. Da Nutlin-3 in DMSO gelöst ist, diente die Behandlung einiger Zellen jeder Gruppe mit DMSO als Negativkontrolle. In den letzten 2 h dieser Inkubation wurde EdU in einer Konzentration von 10 µM zum Kulturmedium hinzugefügt. Anschließend wurden alle Zellen mithilfe einer formaldehydhaltigen Lösung fixiert und das EdU an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 gekoppelt. Die Gesamt-DNA wurde mit Hoechst 33342 markiert, um alle Zellkerne zu markieren.

Die Erfassung der jeweiligen emittierten Lichtsignale erfolgte mithilfe des BD Pathway Mikroskops. Pro dargestellter Gruppe wurden mindestens 3.256 und maximal 11.729 Zellen erfasst.
Die Box wird nach unten begrenzt durch die 25. Perzentile, nach oben durch die 75. Perzentile. Der Balken innerhalb der Box zeigt die Position des Medians. Die Whisker werden nach unten begrenzt durch die 5. Perzentile und nach oben durch die 95. Perzentile. Ausreißer, die außerhalb der 5. bis 95. Perzentile liegen, werden als einzelne Punkte dargestellt.

3.8.3 Die Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin-3 verringert die Replikationsrate der einzelnen Zellen zu den Zeitpunkten 3, 4 und 5 h nach Aufhebung eines doppelten Thymidin-Blocks

In vorigen Versuchen konnte der Beginn der Replikation nach Aufhebung eines doppelten Thymidin-Blocks unter Nutlin-Einfluss beobachtet werden. Es zeigte sich zudem, dass sich im mittleren Verlauf der S-Phase (entsprechend den Zeitpunkten 4, 6 und 8 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks) die Inkorporation von EdU in U2OS-Zellen, die mit Nutlin-3 behandelt wurden, von denen einer Kontrolle mit DMSO deutlich unterschied. Während die mit Nutlin-3 behandelten Zellen eine über die Zeitpunkte 4 bis 8 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks konstante Replikationstätigkeit zeigten, konnte in der mit DMSO behandelten Kontrolle ein Ansteigen und Abfallen der Replikationstätigkeit mit einem Maximum zum Zeitpunkt 6 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks beobachtet werden. Zudem zeigten die mit Nutlin-3 behandelten Zellen zu jedem der betrachteten Zeitpunkte eine geringere Replikationstätigkeit als die Kontrolle. Um näher zu untersuchen, welchen Einfluss eine Inkubation mit Nutlin-3 auf die Replikationstätigkeit in der frühen S-Phase dieser Zellen hat, wurde im Folgenden ein Versuch durchgeführt, in dem die Zeitpunkte 3h, 4h und 5h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks betrachtet wurden.

Dazu wurden U2OS-Zellen wie bereits in 3.8.1 beschrieben synchronisiert und während der letzten 4 h des zweiten Thymidin-Blocks mit 10 µM Nutlin-3 beziehungsweise DMSO prä-inkubiert. Analog erfolgte zudem ebenfalls die Behandlung einer asynchronen Gruppe von Zellen. Nach Aufhebung des Thymidin-Blocks in den synchronisierten Zellen erfolgte die anschließende Inkubation mit 10 µM Nutlin-3 oder dessen Lösungsmittel DMSO für weitere 3, 4 und 5 h. In den letzten zwei Stunden dieser Inkubationszeit wurde EdU zu einer Gesamtkonzentration von 10 µM hinzugefügt. In jeder Gruppe wurde zudem eine EdU-Negativkontrolle belassen. Anschließend wurden die Zellen mittels einer formaldehydhaltigen Lösung fixiert. Es erfolgte die Permeabilisierung und in einer Click-Reaktion die Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffs Alexa Fluor an das Thymidin-Analogon EdU. Zudem wurde die Gesamt-DNA der Zellen durch den Fluoreszenzfarbstoff Hoechst

33342 markiert. Somit konnten alle Zellkerne im BD Pathway Mikroskop detektiert und ihre jeweilige Alexa-Fluor-Intensität gemessen werden. Die Verteilung dieser Intensität in den verschiedenen Behandlungsgruppen wurde in einem Boxplot aufgetragen. Zudem erfolgte für die verschiedenen Zeitpunkte die gemeinsame Darstellung der 25. und 75. Perzentile sowie des Medians der Alexa-Fluor-Intensität der Zellen in der S-Phase zur besseren Darstellung des Verlaufs. Das Ergebnis ist in **Abbildung 12** dargestellt.

Zunächst war festzustellen, dass sowohl in den mit DMSO als auch in den mit Nutlin-3 behandelten synchronisierten Zellen ein signifikanter Anstieg der Alexa-Fluor-Intensität über die beobachteten Zeitabschnitte vorlag. Jedoch lagen die gemessenen Intensitätswerte der mit Nutlin-3 behandelten Zellen zu jedem der Zeitpunkte unter denen der mit DMSO behandelten Zellen. In den asynchronen Zellen zeigte sich in beiden Gruppen eine niedrige und in der Tendenz mit der Zeit abnehmende Replikationstätigkeit. Bei Betrachtung der hintergrundkorrigierten Verteilungskennwerte der Alexa-Fluor-Intensität der synchronisierten Zellen ließ sich für die 25. und die 75. Perzentile sowie für den Median in allen Fällen ein Anstieg der Intensität von 3 bis 4 h sowie von 4 bis 5 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks feststellen. Ebenso lagen in allen Fällen die gemessenen Werte der mit Nutlin-3 behandelten Zellen unter denen der DMSO-Kontrolle.

Es bestätigte sich abschließend also auch bei Betrachtung des frühen Verlaufs der S-Phase die Beobachtung, dass die Replikationstätigkeit der mit Nutlin-3 behandelten Zellen unter derjenigen der mit DMSO behandelten Zellen lag. In den ersten Stunden der S-Phase ließ sich noch kein abweichendes Muster der Alexa-Fluor-Intensität zwischen den mit Nutlin-3 behandelten Zellen und der Kontrolle feststellen. Es erfolgte in beiden Gruppen ein Anstieg der Intensität über die Zeit.

In einem weiteren Versuch war nun zu klären, wie sich die Replikationstätigkeit in der späten S-Phase verhält.

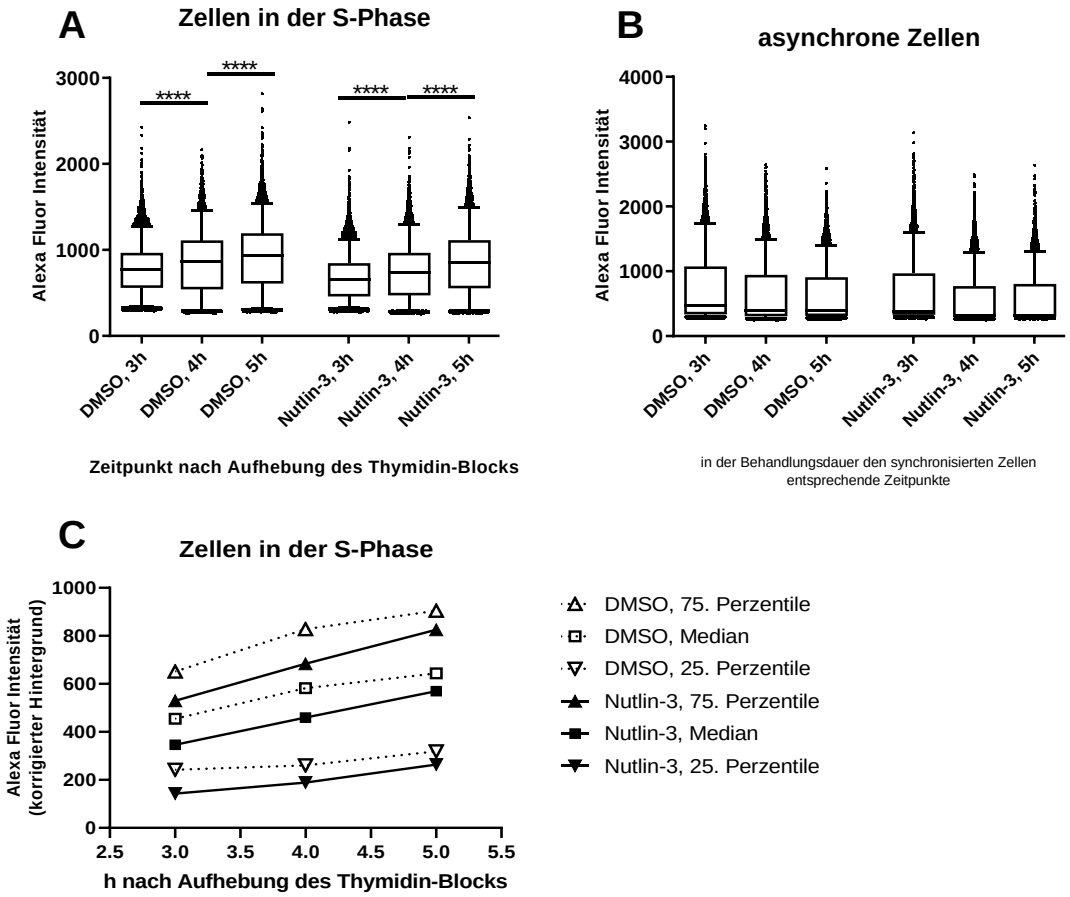

Abbildung 12: Einfluss einer Prä-Inkubation mit Nutlin-3 und anschließend für 3, 4 und 5 h weitergeführter Inkubation auf die Replikation im Verlauf der S-Phase und in asynchronen Zellen

Eine Gruppe von U2OS-Zellen wurde zunächst mithilfe eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert (siehe Kapitel 2.2.1.6). Während der letzten 4 h dieses zweiten Thymidin-Blocks erfolgte eine Prä-Inkubation mit Nutlin-3 in einer Konzentration von 10 µM. Danach wurde der zweite Thymidin-Block durch erneutes dreimaliges Waschen mit Kulturmedium aufgehoben und der Eintritt in die S-Phase somit ermöglicht. Es wurde jedoch weiterhin mit 10 µM Nutlin-3 für verschiedene Zeitspannen inkubiert. Eine Gruppe asynchroner Zellen diente zudem dem Vergleich der Nutlin-3-Wirkung auf asynchrone Zellen mit der Wirkung auf Zellen in der S-Phase. Diese Gruppe wurde jeweils analog zur synchronisierten Gruppe zeitgleich mit Nutlin-3 prä-inkubiert beziehungsweise inkubiert. Da Nutlin-3 in DMSO gelöst ist, diente die Behandlung einiger Zellen jeder Gruppe mit DMSO als Negativkontrolle. In den letzten 2 h dieser Inkubation wurde EdU in einer Konzentration von 10 µM zum Kulturmedium hinzugefügt. Anschließend wurden alle Zellen mithilfe einer formaldehydhaltigen Lösung fixiert und das EdU an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 gekoppelt. Die Gesamt-DNA wurde mit Hoechst33342 markiert, um alle Zellkerne darzustellen. Die Erfassung der jeweiligen emittierten Lichtsignale erfolgte mithilfe des BD Pathway Mikroskops. Pro dargestellter Gruppe wurden mindestens 3.496 und maximal 16.975 Zellen erfasst.

A + B: Verteilung der Alexa-Fluor-Intensitäten der einzelnen Zellen innerhalb einer Behandlungsgruppe: Die Box wird nach unten begrenzt durch die 25. Perzentile, nach oben durch die 75. Perzentile. Der Balken innerhalb der Box zeigt die Position des Medians. Die Whisker werden nach unten begrenzt durch die 5. Perzentile und nach oben durch die 95. Perzentile. Ausreißer, die außerhalb der 5. bis 95. Perzentile liegen, werden als einzelne Punkte dargestellt.

C: Kennwerte der Verteilung der Alexa-Fluor-Intensität im Verlauf der S-Phase: Mithilfe einer EdU-Negativkontrolle zu jedem der untersuchten Zeitpunkte konnte der Hintergrund korrigiert werden.

3.8.4 Die Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin-3 verringert die Replikationsrate der einzelnen Zellen zu den Zeitpunkten 8, 10 und 12 h nach Aufhebung eines doppelten Thymidin-Blocks

In den bisherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass in der frühen S-Phase nach Aufhebung eines doppelten Thymidin-Blocks zunächst sowohl in mit Nutlin-3 inkubierten U2OS-Zellen als auch in der mit DMSO inkubierten Negativkontrolle ein Anstieg der Replikationsrate erfolgt. In der mittleren S-Phase, entsprechend den Zeitpunkten 4, 6 und 8 h nach Aufhebung des Blocks, waren diesbezüglich jedoch Unterschiede festzustellen: Für die mit DMSO behandelten Zellen konnte ein weiterer Anstieg der Replikationstätigkeit gezeigt werden, die ihr Maximum zum Zeitpunkt 6 h nach Aufhebung des Blocks erreichte und danach in einen Abfall überging. In den mit Nutlin-3 behandelten Zellen erreichte die Replikationstätigkeit in diesem Zeitrahmen ein Plateau mit stabiler Replikationsrate über mehrere Stunden hinweg. Es lag nun die Vermutung nahe, dass durch die Inkubation mit Nutlin-3 und demzufolge durch die Aktivität von p53 die Replikation möglicherweise ausgebremst und mit geringerer Geschwindigkeit voranschreiten würde. Dieser Hypothese folgend sollte in einem weiteren Versuch nun betrachtet werden, wie sich die Replikation unter Nutlin-Einfluss im Vergleich zur Kontrolle in der späten S-Phase und zu ihrem Ende hin verhält. Es wurde für möglich gehalten, dass die mit DMSO behandelten Zellen die Verdopplung ihres Genoms aufgrund der erhöhten Rate auch zu einem früheren Zeitpunkt beenden würden, entsprechend die mit Nutlin-3 inkubierten Zellen aufgrund ihrer möglicherweise verlangsamt ablaufenden Replikation eine längere Zeit für dieselbe Aufgabe benötigen würden.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden wie zuvor U2OS-Zellen mittels eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert und 4 h vor Aufhebung des Blocks entweder mit Nutlin-3 oder der entsprechenden Negativkontrolle, DMSO, prä-inkubiert. Analog wurde ebenfalls wie in den bisherigen Versuchen dieser Art auch eine Gruppe asynchroner Zellen entsprechend prä-inkubiert. Nach Aufhebung des Thymidin-Blocks in den synchronisierten Zellen zum Zeitpunkt 0 erfolgte die weitere Inkubation mit Nutlin beziehungsweise DMSO für 8, 10 oder 12 h. In den jeweils letzten 2 h dieser Inkubationszeit wurde dem Kulturmedium zudem EdU zu einer Konzentration von 10 µM hinzugefügt und jeweils eine Negativkontrolle belassen. Zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach Ablauf der zweistündigen Inkubationszeit mit EdU wurden die Zellen mit einer formaldehydhaltigen Lösung fixiert, anschließend permeabilisiert und in einer Click-Reaktion der Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor an das inkorporierte EdU gekoppelt. Zum

Markieren der Gesamt-DNA erfolgte zuletzt die Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342.

Im BD Pathway Mikroskop wurden alle Zellkerne erfasst und ihre jeweilige Alexa-Fluor-Intensität gemessen. Die Verteilung der Intensität in den einzelnen Gruppen wurde in einem Boxplot aufgetragen. Um zudem für die S-Phasen-Zellen den zeitlichen Verlauf der Kennwerte der Verteilung beurteilen zu können, wurden nach erfolgter Hintergrundkorrektur die mediane Alexa-Fluor-Intensität, die 25. sowie die 75. Perzentile nach Zeitpunkten dargestellt. Das Ergebnis dieses Experiments zeigt **Abbildung 13**.

Sowohl für die mit DMSO behandelte Kontrolle als auch für die mit Nutlin-3 behandelten Zellen zeigte sich zwischen den Zeitpunkten acht und zehn Stunden sowie zwischen zehn und zwölf Stunden nach Aufhebung des Thymidin-Blocks ein hochsignifikanter Rückgang der medianen Alexa-Fluor-Intensität, bis diese bei zwölf Stunden nach Aufhebung des Blocks den Wert des Hintergrundrauschens annahm. Die 25. Perzentile beider Gruppen synchroner Zellen erreichte bereits zum Zeitpunkt acht Stunden annähernd das Ende der Replikationstätigkeit. Im Median erreichten beide Gruppen dieses Ende zum Zeitpunkt zehn Stunden, während die Replikation der 75. Perzentile zum Zeitpunkt zwölf Stunden zum Stillstand kam. In den mit Nutlin-3 inkubierten asynchronen Zellen zeigte sich aufgrund der langen Inkubationszeit nun eine deutlich reduzierte Alexa-Fluor-Intensität im Vergleich zur Kontrolle.

Es ließ sich abschließend also festhalten, dass die eingangs des Experiments aufgestellte Hypothese nicht bestätigt werden konnte. Obwohl die Replikationsrate der mit Nutlin-3 behandelten synchronen Zellen im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle wie bisher beobachtet niedriger war, beendeten beide Gruppen die DNA-Replikation zeitgleich.

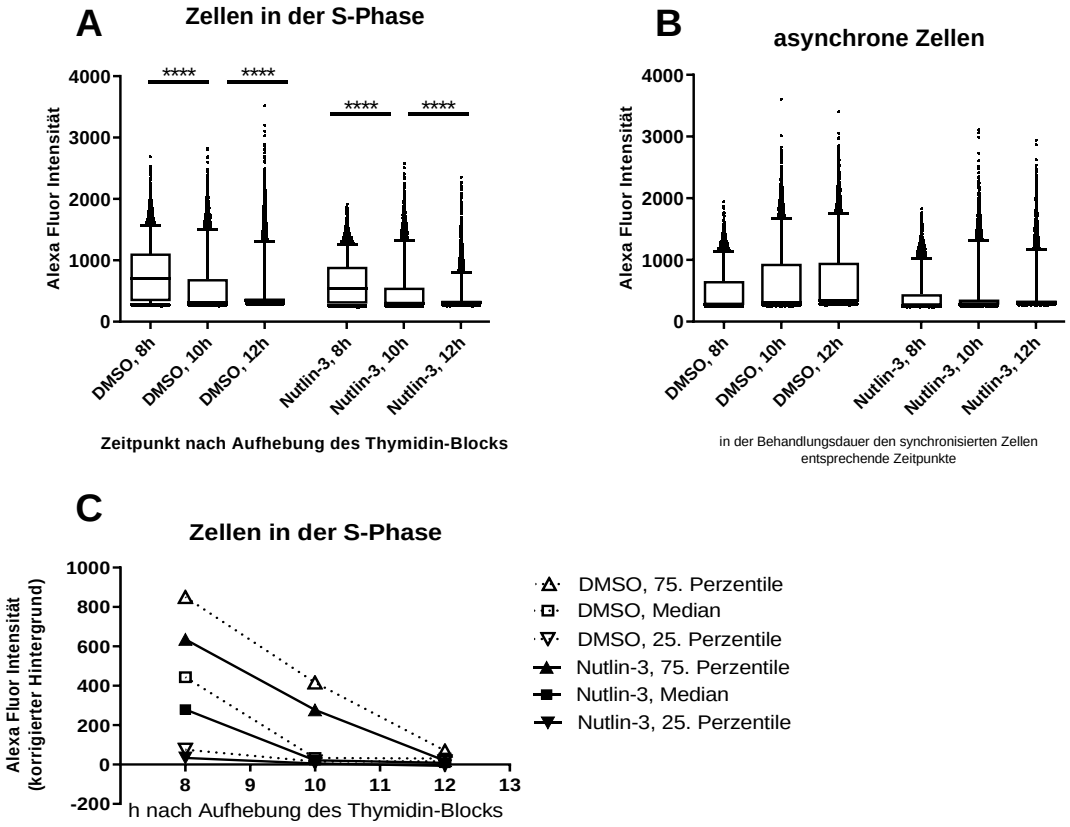

Abbildung 13: Einfluss einer Prä-Inkubation mit Nutlin-3 und anschließend für 8, 10 und 12 h weitergeführter Inkubation auf die Replikation im Verlauf der S-Phase und in asynchronen Zellen

Eine Gruppe von U2OS-Zellen wurde zunächst mithilfe eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert (siehe Kapitel 2.2.1.6). Während der letzten 4 h dieses zweiten Thymidin-Blocks erfolgte eine Prä-Inkubation mit Nutlin-3 in einer Konzentration von 10 µM. Danach wurde der zweite Thymidin-Block durch erneutes dreimaliges Waschen mit Kulturmedium aufgehoben und der Eintritt in die S-Phase somit ermöglicht. Es wurde jedoch weiterhin mit 10 µM Nutlin-3 für verschiedene Zeit-spannen inkubiert. Eine Gruppe asynchroner Zellen diente zudem dem Vergleich der Nutlin-3-Wirkung auf asynchrone Zellen mit der Wirkung auf Zellen in der S-Phase. Diese Gruppe wurde jeweils analog zur synchronisierten Gruppe zeitgleich mit Nutlin-3 prä-inkubiert beziehungsweise inkubiert. Da Nutlin-3 in DMSO gelöst ist, diente die Behandlung einiger Zellen jeder Gruppe mit DMSO als Negativkontrolle. In den letzten 2 h dieser Inkubation wurde EdU in einer Konzentration von 10 µM zum Kulturmedium hinzugefügt. Anschließend wurden alle Zellen mithilfe einer formaldehydhaltigen Lösung fixiert und das EdU an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 gekoppelt. Die Gesamt-DNA wurde mit Hoechst 33342 markiert, um alle Zellkerne darzustellen. Die Erfassung der jeweiligen emittierten Lichtsignale erfolgte mithilfe des BD Pathway Mikroskops. Pro dargestellter Gruppe wurden mindestens 8.168 und maximal 22.027 Zellen erfasst.

A + B: Verteilung der Alexa-Fluor-Intensitäten der einzelnen Zellen innerhalb einer Behandlungsgruppe: Die Box wird nach unten begrenzt durch die 25. Perzentile, nach oben durch die 75. Perzentile. Der Balken innerhalb der Box zeigt die Position des Medians. Die Whisker werden nach unten begrenzt durch die 5. Perzentile und nach oben durch die 95. Perzentile. Ausreißer, die außerhalb der 5. bis 95. Perzentile liegen, werden als einzelne Punkte dargestellt.

C: Kennwerte der Verteilung der Alexa-Fluor-Intensität im Verlauf der S-Phase: Mithilfe einer EdU-Negativkontrolle zu jedem der untersuchten Zeitpunkte konnte der Hintergrund korrigiert werden.

3.9 Die Prä-Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin-3 während der letzten Stunden eines Thymidin-Blocks führt zu einer Induktion p53-responsiver Gene in der anschließenden S-Phase

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass die Prä-Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin-3 während der letzten 4 h eines Thymidin-Blocks in der sich anschließenden S-Phase zu einem negativen Effekt auf die Replikationsrate, nicht jedoch auf die Anzahl der replizierenden Zellen und den zeitlichen Ablauf der Replikation führte. Es konnte zudem gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit Nutlin-3 während der S-Phase eine Induktion verschiedener p53-responsiver Gene möglich ist. Es sollte nun im Folgenden untersucht werden, ob verschiedene p53-Zielgene auch dann induziert werden können, wenn die Inkubation mit Nutlin-3 nicht erst während der S-Phase begonnen wird, sondern durch eine Prä-Inkubation bereits beim Eintritt in die S-Phase hohe p53-Spiegel in der Zelle vorherrschen. Um einen ersten Überblick zu gewinnen, wurden einzelne Zielgene mit verschiedenen zellulären Funktionen untersucht.

Dazu wurden wie bisher zunächst Zellen mittels eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert. Während der letzten 4 h des zweiten Thymidin-Blocks erfolgte die Prä-Inkubation mit 10 µM Nutlin-3 beziehungsweise dessen Lösungsmittel DMSO. Analog erfolgte die Prä-Inkubation asynchroner Zellen. Zum Zeitpunkt 0 wurde in einer Gruppe der synchronisierten Zellen der Thymidin-Block aufgehoben, um die Zellen in die S-Phase zu entlassen, in einer anderen Gruppe wurde das Thymidin im Kulturmedium belassen. Ab diesem Zeitpunkt wurden asynchrone und synchrone Zellen aller Gruppen für weitere 4 h mit Nutlin-3 oder DMSO inkubiert. Abschließend erfolgten die Isolation der RNA, eine reverse Transkription und die Quantifizierung der Geninduktion mittels q-PCR unter Verwendung spezifischer Primer für das jeweilig untersuchte p53-Zielgen. Um vergleichbare Daten zu erhalten, wurde ebenfalls die Menge des konstitutiv exprimierten Haushaltsgens *36B4* bestimmt und die gemessenen Werte der Zielgene darauf normiert.

Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse für das p53-responsive Gen *p21*(*CDKN1A*). Für alle beobachteten Konditionen (S-Phase, Thymidin-Block und asynchron) ließ sich zunächst eine Induktion von *p21* durch die Behandlung mit Nutlin-3 feststellen. Sowohl in den asynchronen als auch in den Zellen in der S-Phase war diese Induktion zudem signifikant. Auch in diesem Experiment zeigte sich, wie bereits in anderen Versuchen teilweise beobachtet, ein leichter Anstieg der Expressionswerte in der DMSO-Kontrolle in den beiden Gruppen synchronisierter Zellen. In den asynchronen Zellen erfolgte eine Induktion um den Faktor 3,59. In den Zellen, die im Thymidin-Block belassen wurden, stiegen die Absolutwerte sowohl der Kontrolle als auch der mit Nutlin-3 behandelten Gruppe an, sodass

sich insgesamt eine Induktion um den Faktor 2,3 ergab. Bei nur leichtem Anstieg der Genexpression in der Kontrolle zeigte sich in der Gruppe von Zellen, die sich in der S-Phase befand, eine starke Induzierbarkeit durch die Inkubation mit Nutlin-3 um den Faktor 4,08. Es ließ sich also abschließend festhalten, dass auch bei Prä-Inkubation mit Nutlin-3 eine signifikante Induzierbarkeit des p53-responsiven Gens *p21* während der S-Phase beobachtet werden konnte. Im Vergleich zu asynchronen Zellen und solchen, die nicht aus dem Thymidin-Block entlassen wurden, fiel diese sogar besonders stark aus.

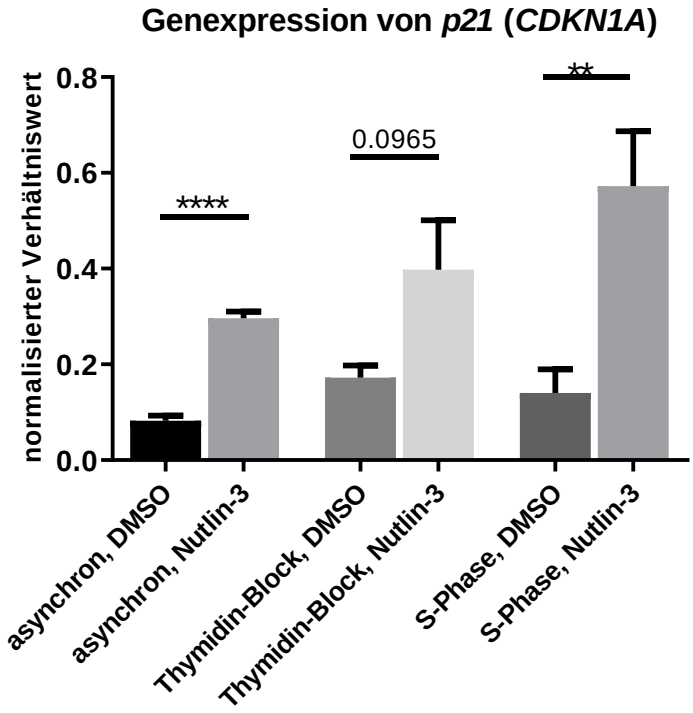

Abbildung 14: Genexpression von *p21* (*CDKN1A*) nach Prä-Inkubation und weitergeführter Inkubation mit Nutlin-3 in asynchronen und synchronisierten U2OS-Zellen

Zwei Gruppen von U2OS-Zellen wurden zunächst mithilfe eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert. Dies erfolgte durch Inkubation mit Thymidin in einer Konzentration von 2 mM für 17 h, anschließendem dreifachen Waschen der Zellen mit Zellkulturmedium und Inkubation in Kulturmedium für 8 h, sowie einer weiteren Inkubation mit 2 mM Thymidin für 17 h. In den letzten 4 h dieses zweiten Thymidin-Blocks erfolgte eine Prä-Inkubation mit 10 µM Nutlin-3 und als Negativkontrolle eine Inkubation mit dessen Lösungsmittel DMSO. Analog wurde zudem eine Gruppe asynchroner Zellen prä-inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 wurde der zweite Thymidin-Block durch erneutes dreimaliges Waschen mit Kulturmedium in einem Teil der synchronisierten Zellen aufgehoben und der Eintritt in die S-Phase somit ermöglicht (S-Phase), in einem anderen Teil wurde das Thymidin im Kulturmedium belassen und der Block somit nicht aufgehoben (Thymidin-Block). Es wurde für weitere 4 h mit Nutlin-3 beziehungsweise DMSO inkubiert. Die Gruppe asynchroner Zellen (asynchron) diente dem Vergleich der Nutlin-3-Wirkung auf asynchrone Zellen mit der Wirkung auf Zellen in der S-Phase.
4 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks erfolgte in allen Behandlungsgruppen die Isolation der RNA, eine reverse Transkription sowie eine quantitative Realtime-PCR mit spezifischen Primern für das p53-responsive Gen *p21* (*CDKN1A*). Gezeigt ist die Genexpression in Form eines Verhältniswertes, der auf die Expression des konstitutiv exprimierten Haushaltsgens *36B4* normiert ist.

In **Abbildung 15 A** sind die Ergebnisse für das p53-Zielgen *PCNA* dargestellt. Es ließ sich feststellen, dass in allen drei untersuchten Konditionen eine schwache Induzierbarkeit der Expression von *PCNA* durch die Behandlung mit Nutlin-3 vorlag, die jedoch nicht signifikant war. Auch hier zeigte sich ein Anstieg sowohl der absoluten Expressionswerte in der Kontrolle als auch in der mit Nutlin-3 behandelten Gruppe in den synchronisierten Zellen. Für die asynchronen Zellen ergab sich eine schwache Induzierbarkeit um den Faktor 1,31. In den Zellen, die im Thymidin-Block belassen wurden, war eine Induzierbarkeit um den Faktor 1,3 zu beobachten. In den Zellen, die sich in der S-Phase befanden, war durch die Behandlung mit Nutlin-3 eine ebenfalls schwache, aber im Vergleich die größte Induzierbarkeit der Genexpression um den Faktor 1,37 festzustellen. Es ließ sich abschließend festhalten, dass eine schwache, jedoch nicht signifikante Induzierbarkeit der Genexpression des p53-responsiven Gens *PCNA* durch die Inkubation mit Nutlin-3 hervorzurufen war. Innerhalb der einzelnen Gruppen unterschied sich die Induzierbarkeit nicht.

Abbildung 15 B zeigt das Ergebnis für das p53-Zielgen *P53R2* (*RRM2B*). Es ließ sich für alle drei betrachteten Konditionen eine signifikante Induktion der Genexpression von *P53R2* (*RRM2B*) durch die Inkubation mit Nutlin-3 gegenüber der Kontrolle feststellen. Die Absolutwerte der Genexpression lagen in den synchronisierten Zellen etwas höher als in den asynchronen Zellen. Es zeigte sich zudem ein leichter Anstieg der Expressionswerte in den DMSO-Kontrollen der synchronisierten Zellen. In der Gruppe der asynchronen Zellen ergab sich durch die Behandlung mit Nutlin-3 eine Induktion um den Faktor 2,15. In den Zellen, die nicht aus dem Thymidin-Block entlassen wurden, erfolgte eine Induktion um den Faktor 2,21. In den synchronisierten und sich in der S-Phase befindenden Zellen betrug dieser Faktor den Wert 2,15. Zusammenfassend ließ sich festhalten, dass in allen untersuchten Konditionen eine signifikante Induktion der Genexpression des p53-responsiven Gens *P53R2* durch die Inkubation mit Nutlin-3 erfolgte. Das Ausmaß der Induzierbarkeit war zudem in den Gruppen vergleichbar und zeigte keine wesentlichen Unterschiede zwischen der S-Phase und nicht-S-Phase.

Die Ergebnisse der qRT-PCR für das p53-Zielgen *14-3-3σ* (*SFN*) zeigt **Abbildung 15 C**. Für keine der drei Konditionen konnte eine signifikante Induktion der Genexpression durch eine Inkubation mit vorausgegangener Prä-Inkubation mit Nutlin-3 gezeigt werden. Für die Gruppe der asynchronen Zellen zeigte sich eine sehr schwache Induzierbarkeit um den Faktor 1,3. In den synchronisierten und im Thymidin-Block belassenen Zellen zeigte sich

im Vergleich mit den asynchronen Zellen ein Anstieg der Genexpression sowohl in der Kontrolle als auch in der mit Nutlin-3 behandelten Gruppe, wobei letzterer stärker ausfiel. Es ließ sich eine Induktion um den Faktor 1,6 messen. In den synchronisierten und in die S-Phase entlassenen Zellen zeigte sich im Vergleich mit den im Thymidin-Block belassenen Zellen ein weiterer Anstieg der Genexpression sowohl in der Kontrolle als auch durch die Behandlung mit Nutlin-3. Die Induktion erfolgte um den Faktor 1,5. Zusammenfassend konnte also eine etwas stärkere Induktion in den synchronisierten Zellen beobachtet werden, in keiner Gruppe war diese jedoch signifikant. Es ließ sich also in der Tendenz eine Induzierbarkeit des p53-responsiven Gens *14-3-3σ* (*SFN*) während der S-Phase auch in diesem Experiment vermuten. Um eine sichere Aussage insbesondere über eine eventuell zellzyklusspezifische Expression treffen zu können, waren jedoch weitere Versuche notwendig.

Zuletzt zeigt **Abbildung 15 D** die Ergebnisse des p53-responsiven Gens *PUMA* (*BBC3*). In allen drei Konditionen ließ sich eine Induktion der Genexpression des p53-Zielgens *PUMA* (*BBC3*) beobachten. Die Gruppe der asynchronen Zellen zeigte eine Induktion um den Faktor 3,47. Im Vergleich dazu zeigten die im Thymidin-Block belassenen Zellen einen deutlichen Anstieg der Genexpression sowohl in der DMSO-Kontrolle als auch in der mit Nutlin-3 behandelten Gruppe. Hier lag eine Induktion um den Faktor 2,24 vor. In den Zellen, die sich in der S-Phase befanden, war dieser Anstieg im Vergleich weniger deutlich ausgeprägt. Es fand sich eine signifikante Induktion der Genexpression um den Faktor 2,88. Zusammenfassend ließ sich also festhalten, dass auch im Fall des p53-responsiven Gens *PUMA* (*BBC3*) eine Induzierbarkeit während der S-Phase durch die Prä-Inkubation mit Nutlin-3 vorlag. Dies entsprach den Tendenzen, die sich bereits in vorigen Versuchen zeigten.

Im Rahmen dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass auch dann p53-responsive Gene während der S-Phase induziert werden können, wenn die Zellen bereits mit einer erhöhten Konzentration an aktivem p53 in die S-Phase starten.

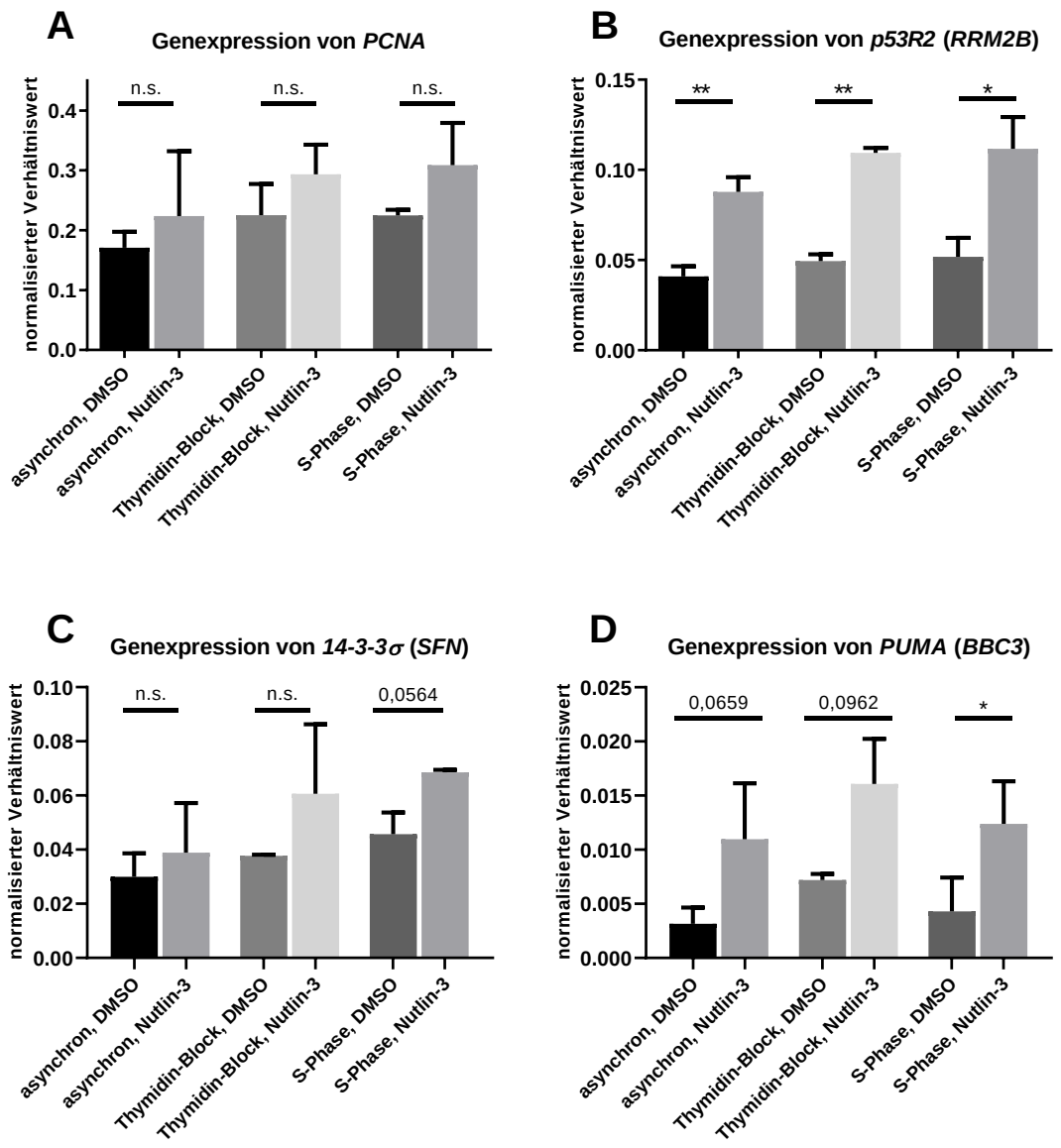

Abbildung 15: Genexpression verschiedener p53-responsiver Gene nach Prä-Inkubation und weitergeführter Inkubation mit Nutlin-3 von asynchronen und synchronisierten U2OS-Zellen

Zwei Gruppen von U2OS-Zellen wurden zunächst mithilfe eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert (siehe 2.2.1.6). In den letzten 4 h des zweiten Thymidin-Blocks erfolgte eine Prä-Inkubation mit 10 µM Nutlin-3 und als Negativkontrolle eine Inkubation mit dessen Lösungsmittel DMSO. Analog wurde zudem eine Gruppe asynchroner Zellen prä-inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 wurde der zweite Thymidin-Block durch erneutes dreimaliges Waschen mit Kulturmedium in einem Teil der synchronisierten Zellen aufgehoben und der Eintritt in die S-Phase somit ermöglicht (S-Phase), in einem anderen Teil wurde das Thymidin im Kulturmedium belassen und der Block somit nicht aufgehoben (Thymidin-Block). Es wurde für weitere 4 h mit Nutlin-3 beziehungsweise DMSO inkubiert. Die Gruppe asynchroner Zellen (asynchron) diente dem Vergleich der Nutlin-3-Wirkung auf asynchrone Zellen mit der Wirkung auf Zellen in der S-Phase.
4 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks erfolgte in allen Behandlungsgruppen die Isolation der RNA, eine reverse Transkription sowie eine quantitative Realtime-PCR mit spezifischen Primern für das jeweilige p53-responsive Gen. Gezeigt ist die Genexpression in Form eines Verhältniswertes, der auf die Expression des konstitutiv exprimierten Haushaltsgens *36B4* normiert ist.

Genexpression von **A:** *PCNA* **B:** *p53R2 (RRM2B)* **C:** *14-3-3σ (SFN)* **D:** *PUMA (BBC3)*

3.10 Die Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin-3 führt sowohl in asynchronen Zellen als auch während der ungestörten S-Phase zu einer p53-mediierten Induktion einer Vielzahl verschiedener Gene

Bisher wurde in mehreren Experimenten gezeigt, dass durch die Behandlung von U2OS-Zellen mit Nutlin-3 eine Induktion einzelner p53-responsiver Gene auch während der S-Phase möglich ist. Es wurde mit der vorliegenden Arbeit jedoch angestrebt, ein möglichst umfassendes Bild der transkriptionellen Aktivität des Tumorsuppressors p53 während der S-Phase zu erhalten. Aus diesem Grund sollte in einem weiteren Experiment mithilfe einer mRNA-Sequenzierung aus dem Spektrum des *Next Generation Sequencing* untersucht werden, ob die Induzierbarkeit während der ungestörten S-Phase generell auf die Vielzahl bekannter p53-responsiver Gene zutrifft. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob Gruppen von funktionell zusammengehörigen Genen bestehen, die nur in einer der zu untersuchenden Konditionen induzierbar sind, also eine p53-abhängige Zellzyklusspezifität zeigen. Dazu wurden U2OS-Zellen zunächst durch Anwendung eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert. In den letzten 4 h des zweiten Thymidin-Blocks erfolgte eine Prä-Inkubation mit 10 μM Nutlin-3 oder dem Lösungsmittel DMSO als Negativkontrolle. Analog erfolgte die Prä-Inkubation asynchroner Zellen. Zum Zeitpunkt 0 wurde ein Teil der synchronisierten Zellen aus dem Thymidin-Block in die S-Phase entlassen, ein anderer Teil verblieb in diesem Block. Alle Gruppen wurden sodann für weitere 4 h mit Nutlin-3 oder DMSO inkubiert. Anschließend erfolgten die Isolation der RNA und die Übergabe der Proben an das Transkriptom-Analyse-Labor (TAL) der Universitätsmedizin Göttingen zur Durchführung einer mRNA-Sequenzierung (siehe Kapitel 2.2.2.7). Die erhaltenen Daten wurden von Magdalena Wienken analysiert und graphisch aufbereitet in Form von Heatmaps zur Verfügung gestellt, wobei Gene mit einer mindestens zweifachen Induktion und einem p-Wert < 0,05 in die Analyse eingeschlossen wurden.

Das Ergebnis des Experiments zeigt **Abbildung 16**. Zunächst ließ sich feststellen, dass durch die Inkubation mit Nutlin-3 sowohl in asynchronen Zellen als auch während der S-Phase die Induktion einer großen Anzahl von Genen erfolgte, die somit als p53-responsiv anzusehen waren. In allen untersuchten Konditionen ergab sich dadurch eine optisch weitgehend homogene Darstellung der Ergebnisse. Wie erwartet zeigte sich während der S-Phase unter anderem eine signifikante Induzierbarkeit einiger bereits in vorherigen Experimenten untersuchter Gene wie *CDKN1A* (*p21*), *BBC3* (*PUMA*) oder *RRM2B* (*p53R2*) sowie bekannter p53-Zielgene wie *MDM2*. Auch pro-apoptotische Gene wie *FAS* oder *PIDD* wurden während der S-Phase durch p53 induziert. Die meisten der

betrachteten Gene waren also unabhängig vom Zellzyklus sowie grundsätzlich auch während der ungestörten S-Phase induzierbar. Insbesondere ergab sich durch das hier vorgestellte Experiment kein Hinweis auf ein p53-mediiertes S-Phasen-spezifisches Expressionsmuster ganzer Gruppen von Genen in ungestörten Zellen.

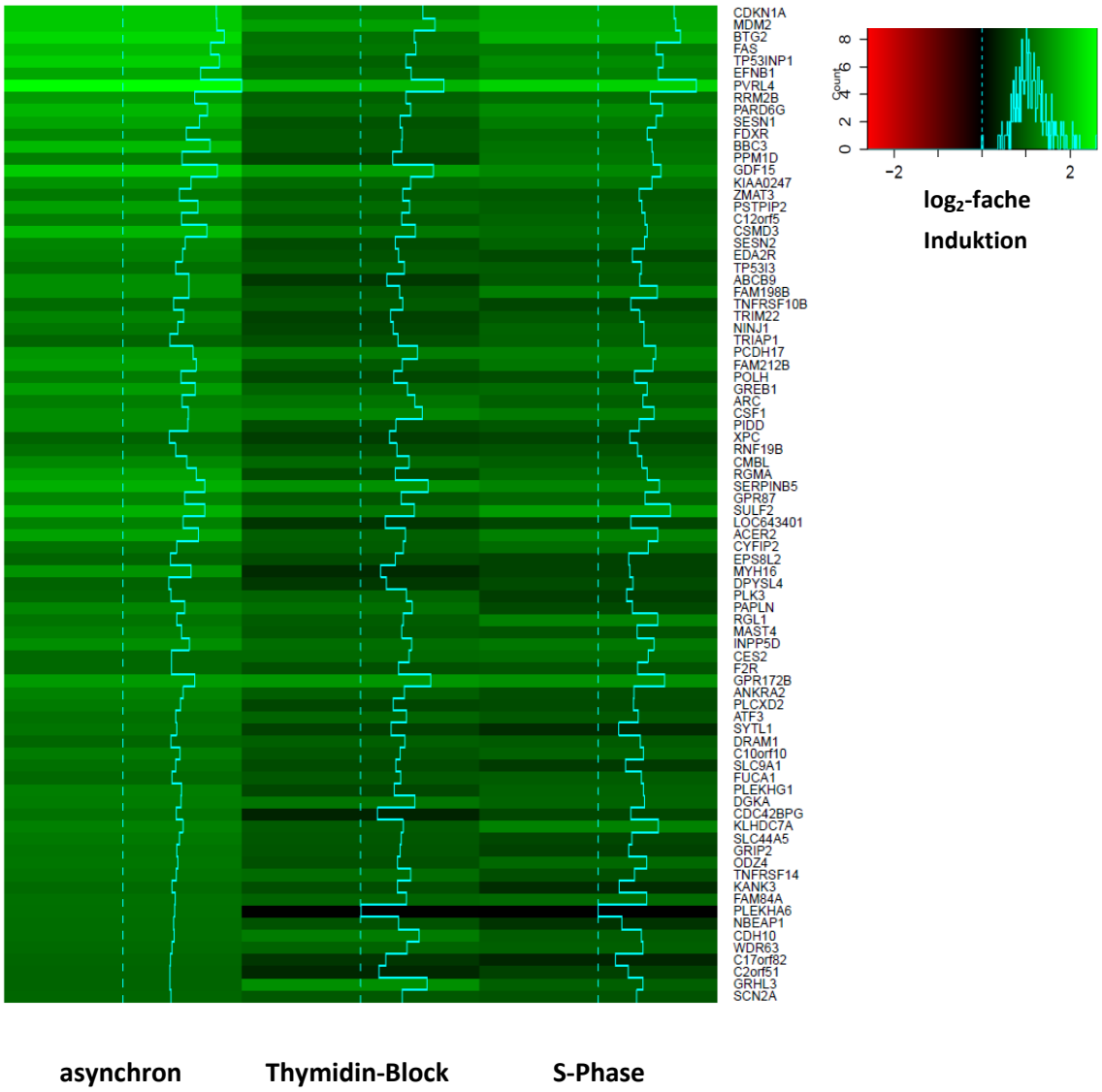

Abbildung 16: Nutlin-3-Behandlung von asynchronen und synchronisierten, zu Beginn der S-Phase blockierten sowie in der S-Phase befindlichen U2OS-Zellen: Betrachtung der Geninduktion durch p53 mittels RNA-Sequenzierung

Zwei Gruppen von U2OS-Zellen wurden zunächst mithilfe eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert (siehe 2.2.1.6). In den letzten 4 h des zweiten Thymidin-Blocks erfolgte eine Prä-Inkubation mit 10 µM

Nutlin-3 und als Negativkontrolle eine Inkubation mit dessen Lösungsmittel DMSO. Analog wurde zudem eine Gruppe asynchroner Zellen prä-inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 wurde der zweite Thymidin-Block durch erneutes dreimaliges Waschen mit Kulturmedium in einem Teil der synchronisierten Zellen aufgehoben und der Eintritt in die S-Phase somit ermöglicht (S-Phase), in einem anderen Teil wurde das Thymidin im Kulturmedium belassen und der Block nicht aufgehoben (Thymidin-Block). Es wurde für weitere 4 h mit Nutlin-3 beziehungsweise DMSO inkubiert. Die Gruppe asynchroner Zellen (asynchron) diente dem Vergleich der Nutlin-3-Wirkung auf asynchrone Zellen mit der Wirkung auf Zellen in der S-Phase.

4 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks erfolgte in allen Behandlungsgruppen die Isolation der RNA. Diese wurde anschließend mittels *Next Generation Sequencing* sequenziert und die Induktion p53-responsiver Gene gemäß dem abgebildeten Farbschema und sortiert nach p-Werten dargestellt. In die Analyse eingeschlossen wurden Gene mit einer Induktion >2-fach und einem p-Wert <0,05.

3.11 Die Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin oder Gemcitabin während der S-Phase führt auf mRNA-Ebene zu Unterschieden in der Expression p53-responsiver Gene

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde durch die Inkubation mit Nutlin-3 eine Akkumulation des Tumorsuppressors p53 erreicht und dessen transkriptionelle Aktivität sowie die Auswirkungen auf die DNA-Replikation während der S-Phase untersucht. Dabei erfolgte die Akkumulation von p53 aufgrund einer verminderten Degradation und nicht im Rahmen einer DNA-Schadensantwort. In einem abschließenden Experiment sollte nun untersucht werden, ob sich die transkriptionelle Aktivität von p53 verändert, wenn dieses durch eine gezielte Schädigung der Zelle akkumuliert. Somit wäre zu unterscheiden zwischen einer physiologischen Aktivität während der ungestörten S-Phase und der schadensinduzierten Aktivität als Antwort auf replikativen Stress. In diesem Experiment wurde das Pyrimidinanalogon Gemcitabin verwendet, um die Zelle in replikativen Stress zu versetzen. Zusätzlich sollte untersucht werden, wie sich eine Kombination aus Prä-Inkubation mit Nutlin-3 und nachfolgend gleichzeitiger Inkubation mit Nutlin-3 und Gemcitabin während der S-Phase auswirkt.

Zunächst wurden U2OS-Zellen durch Anwendung eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert. Während der letzten 4 h des zweiten Blocks erfolgte in zwei Gruppen von Zellen eine Prä-Inkubation mit Nutlin-3 in einer Konzentration von 10 μM. Als Negativkontrolle diente die Inkubation mit DMSO, dem Lösungsmittel des Nutlins. Analog wurden zudem zwei Gruppen asynchroner Zellen mit Nutlin-3 oder DMSO prä-inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 wurden die synchronisierten Zellen aus dem zweiten Thymidin-Block in die S-Phase entlassen. Nun erfolgte in einer Gruppe synchronisierter sowie asynchroner Zellen eine weitere Inkubation mit Nutlin-3 oder DMSO für 4 h. In einer anderen Gruppe synchronisierter sowie asynchroner Zellen erfolgte zusätzlich zur weiteren

Inkubation mit Nutlin die Inkubation mit Gemcitabin in einer Konzentration von 100 nM für ebenfalls 4 h. In einer dritten Gruppe asynchroner und synchronisierter Zellen, die nicht prä-inkubiert wurde, erfolgte die vierstündige Inkubation mit 100 nM Gemcitabin allein. Als Kontrolle für die Behandlung mit Gemcitabin, das in Wasser gelöst ist, diente eine Gruppe asynchroner und synchroner Zellen, die nicht weiter behandelt wurde. Es handelte sich also insgesamt um fünf verschiedene Gruppen: DMSO, Nutlin, Nutlin+Gemcitabin, Gemcitabin sowie ohne Behandlung.

Nach der jeweils vierstündigen Inkubationsdauer wurde die RNA aller Zellen isoliert. Zuerst erfolgte die cDNA-Synthese durch reverse Transkription. Anschließend wurde die Genexpression verschiedener p53-responsiver Gene durch die Anwendung einer qPCR quantifiziert. Dazu wurden spezifische Primer für *p21*, *P53R2*, *14-3-3σ* sowie *PUMA* verwendet. Zudem erfolgte in jeder der Proben die Quantifizierung des konstitutiv exprimierten Haushaltsgens *36B4*, um die Werte der p53-Zielgene auf die des Haushaltsgens zu normieren. Aufgetragen sind für die verschiedenen Behandlungsgruppen jeweils asynchrone und S-Phasen-Zellen im Vergleich. Das Ergebnis des Experiments ist in **Abbildung 17** dargestellt.

Abbildung 17 A zeigt die Genexpression des p53-responsiven Gens *p21*(*CDKN1A*). Es fiel auf, dass in der Gruppe der mit DMSO behandelten Zellen eine geringe Genexpression von *p21* vorlag, die in der S-Phase geringfügig höher war als in den asynchronen Zellen. Die höchsten Werte wurden durch eine Inkubation mit Nutlin-3 erreicht, wobei die Induktion während der S-Phase noch einmal signifikant stärker ausfiel als in den asynchronen Zellen. Die mit Nutlin-3 und Gemcitabin gleichzeitig inkubierten Zellen zeigten eine signifikant geringere Genexpression als die nur mit Nutlin-3 inkubierten. Zwischen asynchronen und Zellen in der S-Phase ließ sich hier kein wesentlicher Unterschied feststellen. Eine noch geringere Genexpression zeigten die Zellen, die nur mit Gemcitabin inkubiert wurden. Die hier vorliegenden Expressionswerte waren vergleichbar mit denen der asynchronen DMSO-Kontrolle und zeigten keine Unterschiede zwischen asynchronen Zellen und der S-Phase. Die geringste Genexpression wiesen die Zellen auf, die keiner Behandlung unterlagen. Auch hier waren kaum Unterschiede zwischen der S-Phase und asynchronen Zellen zu beobachten. Es ließ sich demnach also festhalten, dass die deutlich stärkste Induktion der Genexpression von *p21* durch die Inkubation mit Nutlin-3 während der S-Phase erfolgte. Auch innerhalb der asynchronen Zellen erfolgte durch Inkubation mit Nutlin-3 die stärkste Induktion. Die Inkubation mit Nutlin-3 und Gemcitabin in Kombination wies Werte zwischen denen der mit Nutlin-3 oder mit Gemcitabin allein inkubierten Zellen auf. Die starke Induktion durch Nutlin-3 wurde durch

Gemcitabin abgeschwächt, jedoch war sie noch immer signifikant höher als in den mit Gemcitabin alleine inkubierten Zellen.
Für die Induzierbarkeit der Genexpression von *p21* ließen sich also deutliche Unterschiede zwischen der Inkubation mit Nutlin-3 und Gemcitabin feststellen.

Abbildung 17 B zeigt die Genexpression des p53-responsiven Gens *p53R2* (*RRM2B*). Es konnte beobachtet werden, dass sich die Werte der asynchronen Zellen und der Zellen in der S-Phase nicht sehr deutlich voneinander unterschieden. Die geringsten Werte ließen sich in der Gruppe ohne Behandlung feststellen, nur geringfügig höher lagen diejenigen der DMSO-Kontrolle. Eine deutliche Induzierbarkeit lag sowohl in den mit Nutlin-3 inkubierten Zellen vor, als auch in Zellen, die mit Nutlin-3 und Gemcitabin gemeinsam inkubiert wurden. Zwischen den S-Phasen-Zellen beider Behandlungsgruppen bestand kein signifikanter Unterschied. In den Zellen, die nur mit Gemcitabin inkubiert wurden, zeigte sich jedoch eine signifikant geringere Genexpression als in der Behandlungsgruppe mit gemeinsamer Nutlin-3- und Gemcitabin-Inkubation. Zusammenfassend ließ sich festhalten, dass auch für *p53R2* ein deutlicher Unterschied in der Induzierbarkeit der Genexpression zwischen der Inkubation mit Nutlin-3 und alleiniger Gemcitabinbehandlung beobachtet werden konnte. Auch in diesem Fall war die Genexpression durch eine Inkubation mit Nutlin-3 deutlich stärker ausgeprägt.

Abbildung 17 C zeigt die Genexpression des p53-responsiven Gens *14-3-3σ* (*SFN*). Zunächst zeigte sich, dass die Expressionswerte in den mit DMSO behandelten Zellen am geringsten ausfielen. Innerhalb dieser Gruppe lag der Wert während der S-Phase jedoch etwas höher als der der asynchronen Zellen. Nur eine gering höhere Genexpression zeigte die mit Nutlin-3 inkubierte Gruppe, wobei auch in diesem Fall der Wert der Zellen in der S-Phase den der asynchronen Zellen überstieg. Eine ebenfalls geringe Expression lag in der unbehandelten Gruppe vor. Hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen asynchronen und Zellen in der S-Phase. Eine nur gering höhere Genexpression war in den Zellen festzustellen, die mit Nutlin-3 und Gemcitabin zusammen inkubiert wurden: In der S-Phase unterschieden sich die Werte nicht signifikant von den Zellen, die nur mit Nutlin-3 inkubiert wurden. Die stärkste Genexpression zeigten die Zellen, die mit Gemcitabin alleine inkubiert wurden. In der S-Phase lag die Genexpression signifikant höher als in der S-Phasen-Gruppe mit kombinierter Nutlin-3- und Gemcitabin-Inkubation Es zeigten sich also auch für *14-3-3σ* Unterschiede in der Genexpression zwischen den mit Nutlin-3 und mit Gemcitabin behandelten Zellen. In diesem Fall war eine stärkere Genexpression durch die Inkubation mit Gemcitabin festzustellen.

Abbildung 17 D zeigt die Genexpression des p53-responsiven Gens *PUMA* (*BBC3*). Zunächst war zu beobachten, dass in den Gruppen, die nicht oder nur mit DMSO behandelt wurden, die geringste Genexpression vorlag. In der mit DMSO behandelten Gruppe lag der Wert der S-Phasen-Zellen jedoch etwas über den asynchronen. Eine signifikant stärkere Genexpression war in den mit Nutlin-3 inkubierten Zellen festzustellen, wobei die Werte der asynchronen und der Zellen in der S-Phase etwa vergleichbar waren. Ebenfalls sehr hohe Expressionswerte zeigten die mit Nutlin-3 und Gemcitabin gemeinsam inkubierten Zellen. Ein starker Unterschied zwischen den asynchronen und den Zellen in der S-Phase herrschte in der Gruppe, die nur mit Gemcitabin inkubiert wurde. Hier zeigte sich der insgesamt höchste Wert der Genexpression in den asynchronen Zellen, während der Wert der Zellen in der S-Phase signifikant darunter und nur wenig über dem der Kontrollen lag. Auch im Vergleich zu den S-Phasen-Zellen mit kombinierter Behandlung zeigten die mit Gemcitabin allein behandelten Zellen während der S-Phase eine signifikant niedrigere Genexpression. Es ließ sich also zusammenfassen, dass im Fall des p53-Zielgens *PUMA* eine Induktion sowohl durch die Inkubation mit Nutlin-3 als auch mit Gemcitabin und einer Kombination aus beiden Chemotherapeutika stattfand. Auffällig war jedoch vor allem der Unterschied zwischen asynchronen und Zellen in der S-Phase, der bei Inkubation mit Gemcitabin bestand.

In dieser Reihe von Experimenten konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in der Genexpression bestanden, wenn die Zellen entweder mit Nutlin-3 oder mit Gemcitabin inkubiert wurden. Die verschiedenen p53-responsiven Gene zeigten dabei jedoch kein einheitliches Expressionsmuster, sondern reagierten unterschiedlich stark auf den Auslöser der p53-Aktivierung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit, die sich mit der Charakterisierung der Funktion von p53 in einer ungestörten S-Phase beschäftigt, sollte an dieser Stelle jedoch nicht weiter ins Detail gegangen werden. Nichtsdestotrotz deutete sich hier interessanterweise an, dass Unterschiede in der p53-Responsivität bestehen könnten zwischen der ungestörten S-Phase und der S-Phase unter replikativem Stress. Aufgrund der festgestellten Tendenzen wäre es in weiteren Experimenten zu erforschen, ob sich diese bestätigen lassen und auch für weitere p53-responsive Gene Unterschiede nachzuweisen sind.

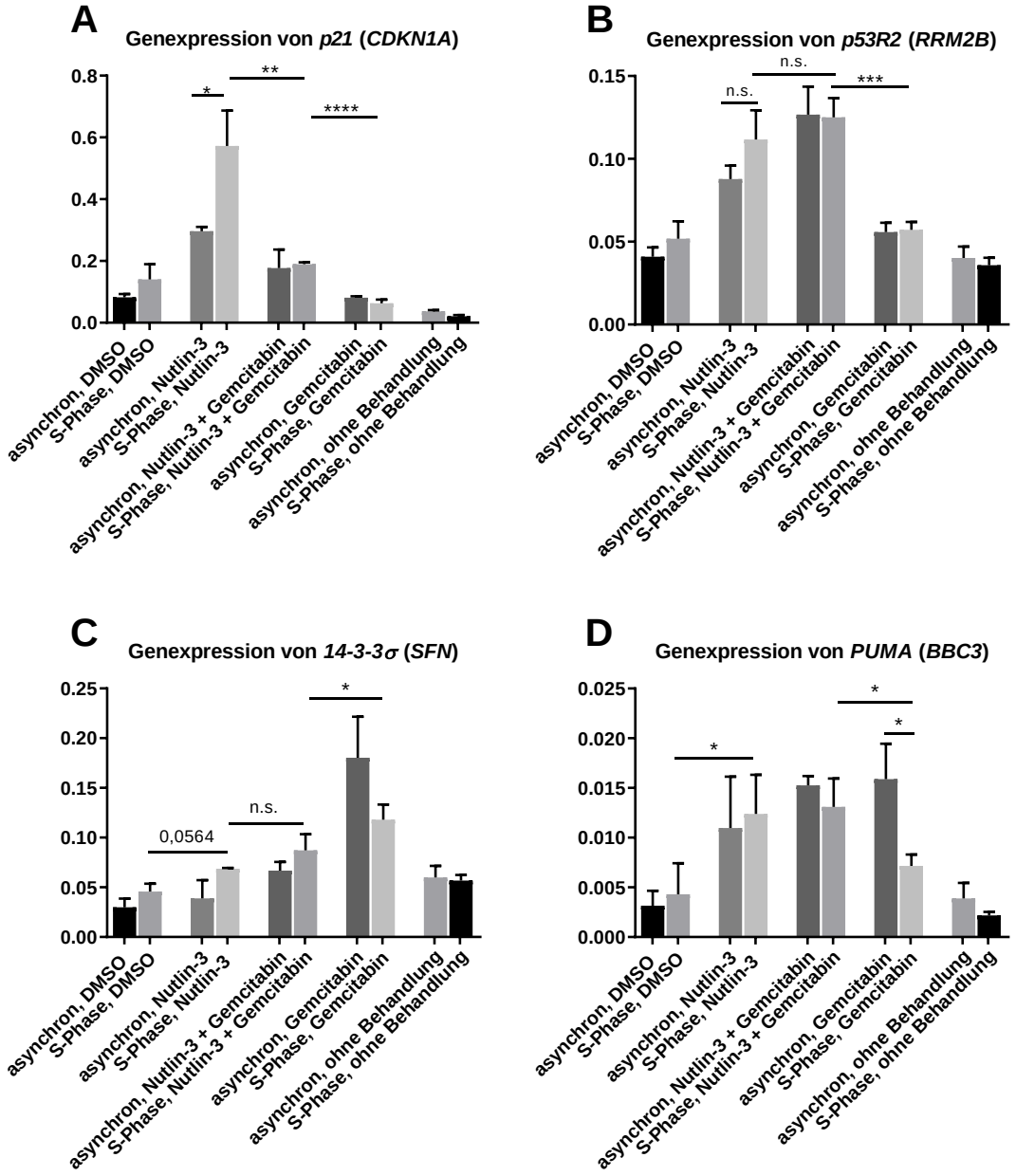

Abbildung 17: Behandlung mit Nutlin-3, Gemcitabin und einer Kombination in asynchronen und U2OS-Zellen in der S-Phase: Genexpression wichtiger p53-responsiver Gene

Zur Synchronisation der Zellen wurde ein doppelter Thymidin-Block angewendet. In den letzten 4 h des zweiten Blocks erfolgte in allen mit Nutlin-3 zu behandelnden Gruppen eine Prä-Inkubation mit 10 µM Nutlin beziehungsweise dem Lösungsmittel DMSO als Negativkontrolle. Analog wurden auch asynchrone Zellen prä-inkubiert. Nach Aufhebung des zweiten Thymidin-Blocks wurde weiterhin mit Nutlin-3 inkubiert; zusätzlich erfolgte nun auch in den entsprechenden Gruppen eine vierstündige Inkubation mit 100 nM Gemcitabin. Als Negativkontrolle für das in Wasser gelöste Gemcitabin diente eine Gruppe ohne Behandlung. 4 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks erfolgte in allen Behandlungsgruppen die Isolation der RNA, eine reverse Transkription sowie eine q-PCR mit spezifischen Primern für die jeweiligen p53-responsiven Gene. Gezeigt ist die Genexpression in Form eines Verhältniswertes, der auf die Expression des konstitutiv exprimierten Haushaltsgens *36B4* normiert ist.

3.12 Die Inkubation von U2OS-Zellen mit Nutlin oder Gemcitabin während der S-Phase führt auf Proteinebene zu Unterschieden in der zellulären Reaktion auf die Akkumulation von p53

Bisher konnte gezeigt werden, dass unter der Bedingung einer ungestörten S-Phase ohne exogen applizierten replikativen Stress auch während der Replikation eine transkriptionelle Aktivität des Tumorsuppressors p53 besteht. In einem letzten Versuch zeigte sich zudem, dass bei der Induktion replikativen Stresses durch die Inkubation mit Gemcitabin Unterschiede in der Expression p53-responsiver Gene auf mRNA-Ebene im Vergleich zur Inkubation mit Nutlin-3 bestehen. Abschließend sollte nun auch auf Proteinebene untersucht werden, wie sich die Inkubation mit Nutlin-3 oder Gemcitabin auf die Akkumulation von p53 und die Induktion eines wichtigen Zielgenprodukts, p21, auswirkt.

Dazu wurden U2OS-Zellen zunächst mittels eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert. Während der letzten 4 h des zweiten Blocks erfolgte in einigen Gruppen von Zellen bereits eine Prä-Inkubation mit 10 µM Nutlin-3 oder dessen Lösungsmittel DMSO. Analog wurden zudem asynchrone Zellen prä-inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 wurden die synchronisierten Zellen aus dem Thymidin-Block in die S-Phase entlassen. Eine Gruppe asynchroner sowie synchronisierter Zellen wurde für weitere 4 h mit Nutlin-3 oder DMSO inkubiert. Eine andere Gruppe aus asynchronen und synchronisierten Zellen wurde für weitere 4 h mit Nutlin-3 und 100 nM Gemcitabin oder mit DMSO und Gemcitabin inkubiert. Die Gruppe asynchroner und synchronisierter Zellen, die zuvor nicht prä-inkubiert worden war, wurde für 4 h mit 100 nM Gemcitabin inkubiert. Als Kontrolle dieser Gruppe diente eine weitere Kohorte, die keiner Behandlung unterlag.

Nach dieser vierstündigen Inkubationszeit wurden alle Zellen in RIPA-Puffer lysiert und die Proteinkonzentrationen der Lysate auf gleiche Werte verdünnt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer SDS-PAGE, anschließend wurden diese mittels Western Blot auf eine Nitrozellulose-Membran überführt. Durch Inkubation mit jeweils spezifischen Antikörpern für Hsc70, p53, p21 und γH2AX wurden die entsprechenden Proteine markiert und in einer Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht. Die Anfärbung von Hsc70 diente in diesem Fall als Ladekontrolle für die korrekte Durchführung der SDS-PAGE mit gleichen Proteinkonzentrationen. γH2AX wurde als Indikator für DNA-Schäden, wie sie durch replikativen Stress entstehen, angefärbt. Das Ergebnis dieses Experiments zeigt **Abbildung 18 A** für asynchrone Zellen sowie **Abbildung 18 B** für Zellen in der S-Phase.

Zunächst zeigte eine gleichmäßige Anfärbung der Banden für Hsc70 sowohl in den asynchronen als auch in den Zellen in der S-Phase eine gleichmäßige Beladung mit Protein sowie eine korrekte Durchführung der Methode an.

In asynchronen Zellen war eine Akkumulation von p53 besonders stark in den mit Nutlin-3 sowie in den mit Nutlin-3 und Gemcitabin zusammen inkubierten Zellen zu sehen, eine deutlich schwächere Akkumulation zeigte sich in den mit Gemcitabin allein und in den mit Gemcitabin und DMSO inkubierten Zellen. Keine nennenswerte Akkumulation von p53 war in den mit DMSO inkubierten sowie in den Zellen ohne Behandlung festzustellen. Eine deutliche Akkumulation von p21 erfolgte lediglich in den mit Nutlin-3 und in den mit Nutlin-3 und Gemcitabin inkubierten Zellen, in allen anderen Gruppen war dies nicht nachzuweisen. γH2AX war in allen mit Gemcitabin behandelten Zellen nachzuweisen, in der Kombination mit Nutlin-3 war die Bande jedoch schwächer ausgeprägt. In der Kombination DMSO und Gemcitabin war diese stärker angefärbt, jedoch zeigte sich die stärkste Akkumulation in den mit Gemcitabin allein behandelten Zellen. Die Inkubation mit Nutlin-3, DMSO oder das Ausbleiben einer Behandlung führten zu keiner messbaren Akkumulation von γH2AX.

In den Zellen, die sich in der S-Phase befanden, erfolgte eine starke Akkumulation von p53 sowohl in den mit Nutlin-3 als auch in den mit Gemcitabin inkubierten Zellen. Eine geringe Akkumulation war in den mit DMSO inkubierten Zellen zu beobachten; in den Zellen ohne Behandlung ließ sich die schwächste Bande für p53 anfärben. Eine sehr stark ausgeprägte Akkumulation von p21 lag in den mit Nutlin-3 inkubierten Zellen vor. Schwächer fiel diese in den mit Nutlin-3 und Gemcitabin zusammen inkubierten Zellen aus. In den Kontrollen sowie in den Gruppen, die mit Gemcitabin allein oder in Kombination mit DMSO inkubiert wurden, fand sich keine Akkumulation von p21. Ausgeprägte Banden für γH2AX zeigten die mit Gemcitabin behandelten Zellen unabhängig von der Co-Inkubation. In den mit Nutlin-3 inkubierten Zellen sowie den beiden Kontrollen war keine Akkumulation von γH2AX nachzuweisen.

Es ließ sich zusammenfassend zunächst festhalten, dass auch auf Proteinebene deutliche Unterschiede in der Responsivität der p53-Targets je nach Auslöser der Akkumulation des Tumorsuppressors p53 bestanden. Dies zeigte sich sowohl in asynchronen Zellen als auch während der synchronisierten S-Phase. Obwohl sowohl Nutlin-3 als auch Gemcitabin in der Lage waren, eine zelluläre Akkumulation von p53 hervorzurufen, unterschied sich die Induzierbarkeit des Zielproteins p21 stark. Während einer ungestörten S-Phase ohne exogen erzeugten replikativen Stress führte die Inkubation mit Nutlin-3 zu einer zellulären Akkumulation von p53, das in der Lage war, sein Zielgen *p21* sowohl auf mRNA- als auch

auf Proteinebene zu induzieren. Die Inkubation mit Gemcitabin während der S-Phase erzeugte hingegen deutlichen replikativen Stress und führte zwar zu einer zellulären Akkumulation von p53, dieses war jedoch nicht in der Lage, sein Zielprotein p21 zu induzieren.

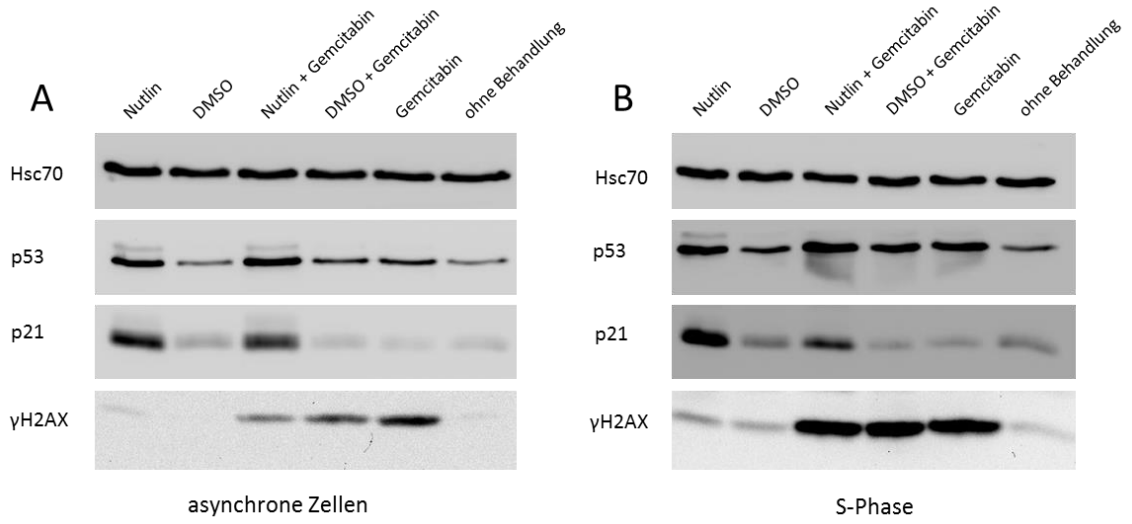

Abbildung 18: Behandlung asynchroner und synchronisierter, sich in der S-Phase befindender U2OS-Zellen mit Nutlin-3, Gemcitabin sowie einer Kombination: Betrachtung des Effekts auf Proteinebene

Zur Synchronisation der Zellen wurde ein doppelter Thymidin-Block angewendet. In den letzten 4 h des zweiten Blocks erfolgte in allen mit Nutlin-3 zu behandelnden Gruppen eine Prä-Inkubation mit 10 µM Nutlin beziehungsweise dem Lösungsmittel DMSO als Negativkontrolle. Analog wurden auch asynchrone Zellen prä-inkubiert. Nach Aufhebung des zweiten Thymidin-Blocks wurde weiterhin mit Nutlin-3 inkubiert; zusätzlich erfolgte nun auch in den entsprechenden Gruppen eine vierstündige Inkubation mit 100 nM Gemcitabin. Als Negativkontrolle für das in Wasser gelöste Gemcitabin diente eine Gruppe ohne Behandlung.
4 h nach Aufhebung des Thymidin-Blocks erfolgte in allen Behandlungsgruppen die Lyse der Zellen in RIPA-Puffer, eine Angleichung der Proteinkonzentration der einzelnen Lysate und die Durchführung einer SDS-PAGE. Die somit nach der Größe aufgetrennten Proteine wurden im Folgenden auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet und mit spezifischen Antikörpern für p53 und das Produkt seines Zielgens, p21, inkubiert. Die Anfärbung des konsitutiv exprimierten Proteins Hsc70 diente als Ladekontrolle für die korrekte Durchführung der Elektrophorese mit gleichen Proteinmengen. γH2AX wurde als Marker für eine Schädigung der DNA ebenfalls angefärbt.

4 Diskussion

Durch die vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Tumorsuppressorprotein p53 in einer ungestörten S-Phase eine große Anzahl seiner Zielgene induzieren kann und somit transkriptionell aktiv ist. Es fand sich kein wesentlicher Unterschied in der Anzahl oder funktionellen Spezifikation der Zielgene im Vergleich zu anderen Zellzyklusphasen im Sinne einer zellzyklusspezifischen Transkriptionsaktivität. Zudem wurde beobachtet, dass in der Abwesenheit von genotoxischem Stress auch unter erhöhten zellulären p53-Spiegeln ein reguläres Durchlaufen der S-Phase erfolgt. Die Replikation des Genoms geschieht dabei innerhalb derselben Zeitspanne wie in Zellen ohne erhöhte p53-Aktivität, allerdings mit einer über die Zeit stabilen und signifikant niedrigeren Replikationsrate.

Deutliche Unterschiede ergaben sich, wenn während der S-Phase genotoxischer Stress durch die Inkubation mit Gemcitabin ausgelöst wurde: Unter diesen Bedingungen zeigte sich zwar eine Akkumulation von p53, jedoch gleichzeitig eine funktionelle Einschränkung bezüglich der Induktion bestimmter Zielgene.

Im Folgenden sollen zunächst die Ergebnisse dieser Arbeit mit der Literatur abgeglichen und neue Erkenntnisse herausgearbeitet sowie in einen größeren Zusammenhang eingeordnet werden. Anschließend erfolgen eine kritische Betrachtung der Arbeit und ein Ausblick auf sinnvolle Folgeexperimente.

4.1 Abgleich der Ergebnisse mit der Literatur und Einordnung in einen größeren Zusammenhang

Die Rolle des Tumorsuppressors p53 in der S-Phase war zu Beginn dieser Arbeit in der Literatur noch unklar und von verschiedenen Gruppen kontrovers diskutiert worden. Auch die Aktivität des Proteins in einer ungestörten Zelle wurde bis zu diesem Zeitpunkt nur selten betrachtet (beides siehe Kapitel 1.4).

Hupp und Lane charakterisierten 1994 die in ungestressten Zellen vorliegenden p53-Tetramere als latent und funktionell inaktiv. Sie gingen davon aus, dass es der Phosphorylierung als aktivierendem Mechanismus bedürfe, um eine sequenzspezifische DNA-Bindung und somit die Zielgeninduktion zu erreichen (Hupp und Lane 1994). Jedoch diente in diesen Versuchen nicht die Messung der tatsächlichen Induktion verschiedener

p53-responsiver Gene als Anzeiger für transkriptionelle Aktivität, sondern lediglich die experimentell bestimmte DNA-Bindung.
Spätere Studien zeigten, dass unabhängig von der stressbedingten Aktivierung auch die Chromatinstruktur der jeweiligen Promotorregion einen Einfluss auf die sequenzspezifische Bindungskapazität von p53 hat (Kim et al. 1999). Durch Chromatinimmunopräzipitation konnte zudem nachgewiesen werden, dass auch in ungestressten Zellen p53 an die Promotorregionen verschiedener Zielgene gebunden vorliegt (Kaeser und Iggo 2002). Diese Arbeiten entkräften das Modell eines primär inaktiven p53-Moleküls ebenso wie die Beobachtung, dass durch den Einsatz des MDM2-Inhibitors Nutlin-3 eine Induktion verschiedener p53-Zielgene möglich ist, ohne dass p53 in DNA-Schadensantwort-typischer Weise phosphoryliert wird (Vassilev 2004).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit fügen sich gut in den Kontext dieser Literatur ein: Während der Behandlung der Zellen mit Nutlin-3 konnten keine erhöhten Spiegel des phosphorylierten Histons H2AX, welches als γH2AX bezeichnet wird und als zellulärer Marker für replikativen Stress dient (Ward und Chen 2001), detektiert werden. Dennoch zeigte sich in den ungestörten Zellen eine eindeutige transkriptionelle Aktivität des Tumorsuppressors, was für ein primär aktives und funktionsfähiges Protein spricht.

In der Annahme, dass sich eine mögliche präventive p53-Funktion zur Vermeidung von Zellschäden insbesondere in vulnerablen Abschnitten des Zellzyklus zeigen würde, wurde in der vorliegenden Arbeit die S-Phase weitergehend untersucht. Die bisherige Literatur postulierte für p53 während dieser Phase eine transkriptionell inaktive Rolle, wenn es zum Stillstand der Replikation kommt (Gottifredi et al. 2001). In diesen Untersuchungen wurden synchronisierte Zellen während der S-Phase unterschiedlichen genotoxischen Einflüssen ausgesetzt und anschließend die Induktion verschiedener Zielgene betrachtet. Die Behandlung mit Gammastrahlung führte zu einer transkriptionellen Aktivität von p53. Wurden die Zellen jedoch mit dem Ribonukleotidreduktase-Inhibitor Hydroxyurea behandelt, zeigte sich die Induktion des Zielgens *p21* stark eingeschränkt, obwohl es auf Proteinebene zur Akkumulation von p53 kam. Gottifredi et al. schlossen daraus, dass das Stehenbleiben von Replikationsgabeln während der DNA-Synthese zu einer funktionellen Inaktivierung des Tumorsuppressors führt. Als Ursache wurde vermutet, dass das Vorkommen von Replikationsblockaden auch während einer regulären S-Phase möglich sei und eine p53-Aktivierung im Sinne einer DNA-Schadensantwort in diesem Zusammenhang möglicherweise eine unangemessene apoptotische Reaktion der Zelle auslösen könne. Aus dieser Beobachtung heraus stellten Gottifredi et al. die Frage, ob p53 auch in einer regulären S-Phase funktionell inaktiv sei. Durch die hier vorliegende Arbeit

kann diese Fragestellung eindeutig verneint werden: In einer ungestörten S-Phase wurden durch die Behandlung mit Nutlin-3 hohe p53-Spiegel erreicht, ohne die Zelle replikativem Stress auszusetzen. Unter diesen Bedingungen konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine Induktion des p53-Zielgens *p21* sowie mittels einer mRNA-Sequenzierung die Induzierbarkeit einer großen Anzahl weiterer p53-responsiver Gene gezeigt werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass p53 während der S-Phase grundsätzlich aktiv ist.

Dennoch nähern sich die hier vorliegenden Ergebnisse der Arbeit von Gottifredi et al. in einem anderen Aspekt. In einem der hier beschriebenen Versuche wurden Zellen während der S-Phase mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin behandelt, das unter anderem zum Stehenbleiben von Replikationsgabeln führt (Plunkett et al. 1995). Der dadurch ausgelöste replikative Stress wurde durch die Akkumulation von γH2AX angezeigt (Ewald et al. 2007). Tatsächlich zeigte sich in dieser speziellen Versuchsanordnung das Ergebnis von Gottifredi et al. reproduzierbar: Es kam auf Proteinebene zur Akkumulation von p53, jedoch nicht zur Induktion des Zielgens *p21*. Zusätzlich sahen wir eine Beeinträchtigung auf mRNA-Ebene in der Induktion von *p53R2*. Interessanterweise betraf die funktionelle Einschränkung der p53-Aktivität in der vorliegenden Arbeit nicht alle untersuchten Zielgene: Die Induktion des pro-apoptotischen Gens *PUMA* gelang während der S-Phase auch unter dem Einfluss von Gemcitabin. Auch in der Arbeit von Gottifredi et al. war die p53-Einschränkung nicht allumfassend, denn das Zielgen *PIG3*, ebenfalls an der Apoptose-Induktion beteiligt, akkumulierte auf Proteinebene mit zunehmender Dauer der HU-Inkubation. Die von Gottifredi et al. argumentierte Interpretation der Ergebnisse erscheint vor diesem Hintergrund jedoch streitbar: Es stellt sich die Frage, ob in Hinblick auf die Abschwächung der p53-Funktion durch stehengebliebene Replikationsgabeln tatsächlich von einer möglicherweise vorteilhaften Situation für die Zelle gesprochen werden kann, wenn diese auch während einer regulären S-Phase auftreten. Die gleichzeitige Inhibition der Akkumulation von p21 und die Induzierbarkeit pro-apoptotischer Zielgene wie *PIG3* und *PUMA* lassen stattdessen die Vermutung zu, dass es sich ganz im Gegenteil bei dem massiven Stehenbleiben von Replikationsgabeln in der aktiven S-Phase um eine Art replikativen Katastrophenfall handeln könnte, in dem die p53-Antwort zugunsten einer Apoptoseeinleitung beeinflusst wird unter negativer Beeinflussung einer Zellzyklusarrest- oder Seneszenz-Induktion durch p21.

In weiteren Versuchen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass unter dem Einfluss von p53 in der ungestörten S-Phase die Replikation nach dem Freilassen der Zellen aus einem doppelten Thymidin-Block zur Synchronisation parallel zu einer Kon-

trollgruppe anläuft und zur gleichen Zeit beendet ist. An jedem untersuchten Zeitpunkt im gesamten Verlauf der S-Phase konnte unter erhöhten p53-Spiegeln eine stabile Replikationstätigkeit durch die Inkorporation des modifizierten Nukleotids EdU nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen bereits für sich betrachtet deutlich dafür, dass p53 – in seinem nicht-schadensaktivierten Zustand und ohne das Vorhandensein exogen applizierten genotoxischen Stresses – nicht per se an der Etablierung oder Aufrechterhaltung eines S-Phasen-Checkpunktes zum Arrest der Replikation beteiligt ist. Gleichzeitig ist aus einer anderen Arbeit bekannt, dass unter der Behandlung mit Nutlinen, die auch in den oben beschriebenen Experimenten zur Erhöhung der p53-Spiegel eingesetzt wurden, durchaus auch nicht-schadensaktiviertes p53 einen G1/S- sowie G2/M-Arrest vermitteln kann (Vassilev 2004). Auch die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse zur negativen Auswirkung einer längeren Inkubation asynchroner Zellen mit Nutlin-3 auf die Replikation weisen auf einen solchen G1/S-Arrest der Zellen hin. Insbesondere im Vergleich zum Vorhandensein der beiden sicher p53-abhängigen Checkpunkte deutet das Fehlen eines S-Phasen-Arrests in diesem Zusammenhang somit eher darauf hin, dass ein solcher über p53-unabhängige Mechanismen mediiert wird. Die hier vorgestellten Ergebnisse stützen daher die Argumente von Bartek et al., die diesen Arrest ebenfalls als von p53 unabhängig betrachten, selbst unter dem Einfluss genotoxischen Stresses und nach dem Auftreten von DNA-Schäden innerhalb der S-Phase (Bartek et al. 2004).

Jedoch zeigte sich in den Experimenten der vorliegenden Arbeit trotz synchronen zeitlichen Ablaufs der S-Phase zwischen den mit Nutlin-3 behandelten Zellen und der Kontrolle ein Unterschied in der Kinetik der Replikationsrate: Während in der Kontrollgruppe die Replikationsrate zunächst anstieg und nach einem Maximum wieder abfiel, herrschte in der Behandlungsgruppe unter p53-Einfluss über weite Teile der Replikation eine annähernd konstante Replikationsrate vor, die insgesamt unter derjenigen der Kontrollgruppe lag. Unter der Annahme einer protektiven basalen p53-Aktivität während der S-Phase ergeben sich daraus verschiedene Möglichkeiten der Interpretation, die im Folgenden näher erläutert werden sollen.

Da eine Beteiligung des Tumorsuppressors p53 an der Reparatur von DNA-Schäden bereits bekannt ist, erscheint es möglich, dass auch im Rahmen der Replikation p53 eine Funktion in der unmittelbaren Reparatur fehlerhaft replizierter DNA ausüben könnte. Einen solchen dualen Funktionsmechanismus für p53 argumentieren Albrechtsen und Janus in ihren jeweiligen Übersichtsartikeln (Albrechtsen et al. 1999; Janus et al. 1999). Ähnlich der in der vorliegenden Arbeit vorgeschlagenen präventiven Funktion von p53 zur Verhinderung von DNA-Schäden befürworten auch diese beiden Autoren ein Modell, in

dem p53 nicht nur auf einen exogen entstandenen Schaden der DNA reagiert, sondern zugleich in seiner basalen, nicht-stressaktivierten Funktion endogene DNA-Schäden während der Replikation beseitigen kann. Es konnte einerseits gezeigt werden, dass p53 in der Lage ist, innerhalb doppelsträngiger DNA Verformungen zu erkennen und zu binden, die unter anderem während der Replikation durch eine fehlerhafte Basenanzahl in einem der beiden Stränge zustande kommen (Lee et al. 1995). Die DNA-Polymerase α ist in besonderem Maß anfällig für den fehlerhaften Einbau von Nukleotiden, da ihr ein 3'-5'-Exonuklease-Mechanismus fehlt, um eine solche Fehlpaarung direkt nach ihrem Zustandekommen zu korrigieren (Kunkel 1992). Erstaunlicherweise zeigte sich andererseits, dass p53 eine eigene 3'-5'-Exonuklease-Aktivität besitzt und während der Replikation die Fehlerrate der Polymerase α deutlich reduzieren kann (Mummenbrauer et al. 1996; Huang 1998). Eine mögliche Beteiligung von p53 an der Mismatch-Reparatur während der S-Phase scheint also mittels Erhöhung der Replikationsgenauigkeit geeignet, zum Schutz der genomischen Integrität beitragen zu können.

Auf theoretischer Ebene kann diese Argumentation mit den hier präsentierten Ergebnissen in Verbindung gebracht werden: Die p53-unterstützte Replikation wäre aufgrund des verstärkten Korrekturlesens und Ausbesserns neu synthetisierter DNA möglicherweise geringfügig langsamer. Durch einen primär weniger fehlerhaften Prozess entstünden jedoch weniger DNA-Schäden, die durch andere Mechanismen der DNA-Reparatur in späteren Abschnitten der S-Phase mit wesentlich aufwendigeren Mitteln behoben werden müssten. Eine somit effizientere Replikation würde pro Zeiteinheit einen geringeren Umsatz an dNTPs erfordern und im Ergebnis zu einem geringeren Einbau von EdU pro Zeiteinheit (also einer geringeren Replikationsrate) führen, wie sie in den hier durchgeführten Experimenten beobachtet wurde.

Ein solcher p53-vermittelter Mechanismus zur verbesserten Mismatch-Reparatur während der Replikation entspräche zweifelsohne einer protektiven Funktion des Tumorsuppressors abseits der klassischen Reaktionen auf einen exogen ausgelösten DNA-Schaden. Dennoch würde es sich auch in diesem Modell genau genommen um eine *ex-post*-Funktion (in diesem Fall auf endogen entstandene DNA-Schäden während der Replikation) von p53 handeln.

Eine andere Möglichkeit der Interpretation der hier vorliegenden Ergebnisse bezüglich einer konstanten, aber verringerten Replikationsrate unter dem Einfluss von p53 während der S-Phase erscheint noch passender im Sinne einer tatsächlichen *ex-ante*-Funktion: Diese ergibt sich aus einer Arbeit unserer eigenen Arbeitsgruppe, zu der auch die hier

vorgestellten Experimente beitragen. Dort wurde der Einfluss von p53 auf das Verhalten von Replikationsgabeln untersucht (Klusmann et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die durch die Behandlung mit Nutlin-3 erhöhte als auch eine basale p53-Aktivität die Prozessivität von Replikationsgabeln steigert. Interessanterweise geschieht dies nicht durch eine Beschleunigung der Replikationsgeschwindigkeit einzelner Gabeln; stattdessen beruht die Prozessivitätssteigerung auf einer Verminderung des Stehenbleibens von Replikationsgabeln. Im selben Versuchsansatz ergab sich zudem eine verringerte Rate der Aktivierung neuer Replikationsursprünge, was einem anderen Bericht über die inverse Korrelation dieser beiden Parameter entspricht (Petermann et al. 2010). Lebofsky et al. berichteten zuvor, dass trotz der großen Anzahl vorhandener potentieller Replikationsursprünge nur einige davon tatsächlich während der Replikation genutzt werden und aktive Ursprünge diejenigen in ihrer unmittelbaren Umgebung scheinbar unterdrücken, um die Abschnitte dazwischen vergrößern zu können (Lebofsky et al. 2006). Ebenso ist bekannt, dass die Geschwindigkeit der Replikationsgabeln einen Einfluss auf die Distanz zwischen einzelnen Ursprüngen hat (Conti et al. 2007). Tatsächlich beobachteten wir eine geringere Kollisionsrate der Gabeln, als anhand der durchschnittlichen Entfernung ihrer Ursprünge zu erwarten gewesen wäre (Conti et al. 2007). Zusammengenommen spricht dies dafür, dass aufgrund der p53-mediierten gesteigerten Prozessivität der Replikationsgabeln weitere Strecken zwischen einzelnen Ursprüngen repliziert werden können und somit weniger Replikationsursprünge aktiviert werden müssen. Diese Theorie lässt sich gut mit den hier vorgelegten Ergebnissen zusammenbringen: Eine kleinere Anzahl gleichzeitig aktivierter Replikationsursprünge würde zu einem niedrigeren Umsatz an dNTPs pro Zeiteinheit führen und die geringere anhand des EdU-Einbaus gemessene Replikationsrate erklären können.

Durch den in diesem Kapitel vorgenommenen Abgleich mit der Literatur und die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse in einem größeren Zusammenhang ergeben sich deutliche Hinweise auf eine präventive, die Zelle vor negativen Einflüssen schützende, und möglicherweise sogar einen *ex-ante*-Mechanismus bedienende Funktion des Tumorsuppressors p53 während der Replikation. Darüber hinaus können die bisherigen Berichte bezüglich der transkriptionellen Aktivität in der S-Phase um die wichtige Erkenntnis ergänzt werden, dass in einer ungestörten S-Phase die Induktion einer großen Anzahl p53-responsiver Gene möglich und p53 somit grundsätzlich aktiv ist.

4.2 Kritische Betrachtung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität des Tumorsuppressorproteins p53 während der S-Phase untersucht. Dazu wurde einerseits die Induzierbarkeit p53-responsiver Gene auf mRNA- sowie Proteinebene bestimmt, sowie andererseits die Dynamik der Replikation im Zeitverlauf beobachtet. In einer Population exponentiell wachsender Zellen sind jedoch alle Phasen des Zellzyklus entsprechend ihres zeitlichen Anteils am Gesamtzyklus nebeneinander vertreten. Zur gezielten Analyse der S-Phase war es deshalb notwendig, die asynchron durch den Zyklus verlaufenden Zellen am G1/S-Übergang zu synchronisieren. Der Mechanismus vieler Methoden zur Zellsynchronisation beruht darauf, dass die Zellen durch den Einsatz von Chemikalien zu Beginn der S-Phase blockiert und anschließend synchron frei gelassen werden. Problematisch ist dabei, dass diese Chemikalien oft massiv in die Homöostase der Zellen eingreifen und so mitunter einen Effekt auf die darauffolgende S-Phase haben können. So verwendeten beispielsweise Gottifredi et al. in ihrer Arbeit zur p53-Funktion während der S-Phase das Chemotherapeutikum Hydroxyurea sowohl, um die Zellen am G1/S-Übergang zu synchronisieren, als auch um während der sich anschließenden S-Phase genotoxischen Stress durch das Stehenbleiben von Replikationsgabeln auszulösen (Gottifredi et al. 2001). Ähnlich wie der Ribonukleotidreduktase-Inhibitor Hydroxyurea wirkt auch Mimosin; zudem können vergleichbare Auswirkungen auf eine Zelle durch den Einsatz des DNA-Polymerase-Inhibitors Aphidicolin ausgelöst werden (Gilbert et al. 1995). Für die beiden letzteren Agenzien konnte gezeigt werden, dass ihr Einsatz zur Synchronisation wahrscheinlich im Rahmen der ausgelösten DNA-Schädigung zu erhöhten p53- und p21-Spiegeln während der darauffolgenden S-Phase führen kann (Ji et al. 1997). Erhöhte Aufmerksamkeit ist also insbesondere angebracht, wenn unter solchen Bedingungen die p53-Aktivität untersucht wird. Da in der vorliegenden Arbeit die Rolle des Tumorsuppressors p53 in der ungestörten S-Phase herausgearbeitet werden sollte, musste eine andere Methode der Zellsynchronisation angewendet werden, um Störeinflüsse minimal zu halten. Eine solche Methode ist unter anderem der doppelte Thymidin-Block, bei dem die Zellen mit nicht-toxischem Thymidin im Überschuss inkubiert werden und es vermutlich zu einer Feedback-Hemmung der Nukleotid-Synthese kommt, die die Zellen am G1/S-Übergang synchronisieren soll (Xeros 1962; Bootsma et al. 1964). Dabei wird die Replikation jedoch nicht komplett blockiert, sodass anstatt einer punktgenauen Synchronisation am G1/S-Übergang vielmehr ein Sammeln der Zellen zu Beginn der S-Phase erfolgt (Bostock et al. 1971). Trotz dieses methodischen Nachteils erscheint der doppelte Thymidin-Block in diesem Fall dennoch als geeignetste der verfügbaren Möglichkeiten: In den hier vorgestellten Experimenten konnte durch den

Vergleich von asynchronen und durch den Thymidin-Block synchronisierten, anderweitig nicht behandelten Zellen gezeigt werden, dass es durch die Synchronisationsbehandlung nicht zu einem Anstieg von γH2AX als Marker einer DNA-Schädigung kommt. Zudem akkumulieren auf Proteinebene weder p53 noch p21 infolge der Synchronisation. In durchflusszytometrischen Untersuchungen erwies sich der Thymidin-Block als praktikabel in der Akkumulation von Zellen mit näherungsweise G1-DNA-Gehalt.

Am geringsten wären die Störungsmöglichkeiten unter der Anwendung eines mechanischen Synchronisationsverfahres gewesen, das *Mitotic-Shake-Off* genannt wird. Dabei werden Zellen, die sich während der Mitose vom Untergrund ihres Kulturgefäßes lösen, durch Schütteln im Überstand des Mediums gesammelt und somit als M-Phasen-Population separiert (genau genommen werden also die Zellen nicht synchronisiert, sondern lediglich eine einzelne Untergruppe entsprechend der regulären Verteilung innerhalb des Zellzyklus isoliert) (Terasima und Tolmach 1963). Diese Methode hätte im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch gravierende Nachteile mit sich gebracht: Zum einen befindet sich entsprechend des geringen Zeitanteils der M-Phase am Gesamtanteil aller Zellzyklusphasen nur ein sehr geringer Prozentsatz an Zellen in der Mitose. Die Gewinnung einer ausreichenden Anzahl an Zellen für die durchgeführten Experimente hätte also die vorherige Kultivierung in einem Ausmaß erfordert, das die Arbeitskraft einer Einzelperson deutlich übersteigt (Schorl und Sedivy 2007). Andererseits wäre der Synchronisationszeitpunkt naturgemäß nicht optimal, um zielgerichtet die S-Phase betrachten zu können. Durch die Unterschiede im Status der M-Phase zum Zeitpunkt des Sammelns sowie die sich anschließende G1-Phase verringert sich der Grad an Synchronizität kontinuierlich (Fox et al. 1987). Es kann daher vermutet werden, dass das Ausmaß der Synchronizität der Zellen beim Eintritt in die S-Phase dasjenige bei Anwendung eines doppelten Thymidin-Blocks nicht erreicht. Letztlich würde auch die zeitliche Dimension eines solchen Versuchsablaufs einer praktischen Anwendung erheblich im Wege stehen.

Interessanterweise wurde in einigen Experimenten der vorliegenden Arbeit in den Zellen, die mittels Thymidin-Block synchronisiert wurden und dann entweder in die S-Phase entlassen oder im Block belassen wurden, eine im Vergleich zu asynchronen Zellen erhöhte Induzierbarkeit verschiedener p53-responsiver Gene auch in der jeweiligen Kontrollgruppe der Nutlin-Behandlung gesehen (siehe Abbildung 6, Abbildung **8**, Abbildung **14** sowie Abbildung **15**). Diese Kontrolle wurde mit dem Lösungsmittel des Nutlins, DMSO, behandelt. Die Induzierbarkeit der verschiedenen Zielgene in den mit Nutlin behandelten Zellen im Thymidin-Block und in der S-Phase steigt im Vergleich zur asynchronen Gruppe in diesen Fällen ebenfalls an. Die relativen Werte der Induzierbarkeit, die sich aus der

Verhältnisbildung von Behandlungs- und Kontrollgruppe ergeben, zeigen diese Veränderungen nur unzureichend an und wurden deshalb in der graphischen Darstellung zugunsten der Einzeldarstellung beider Gruppen nicht berücksichtigt, sondern im Text genannt. Unklar ist jedoch, aus welchem Grund sich diese insgesamt stärkere Induzierbarkeit in den synchronisierten Zellen ergibt. Eine Möglichkeit ist, dass die Synchronisation an sich erhöhte p53-Spiegel auslöst und somit zu einer verstärkten Induktion von Zielgenen führt. Im vorangegangenen Absatz dieses Kapitels wurde jedoch bereits dargestellt, dass durch den doppelten Thymidin-Block in Zellen ohne Behandlung keine Akkumulation von p53 oder p21 auf Proteinebene stattfindet. Abbildung 17 zeigt zudem, dass in unbehandelten Zellen auch auf mRNA-Ebene kein Unterschied in der Induzierbarkeit der verschiedenen Zielgene zwischen asynchronen und Zellen in der S-Phase besteht. Eine weitere Möglichkeit ist, dass durch die Synchronisation oder während der S-Phase an sich die Sensitivität der Zellen gegenüber äußeren Einflüssen wie der chemischen Behandlung steigt und es zu einer stärkeren Induktion von p53-responsiven Genen kommt. Da in den hier durchgeführten Experimenten die S-Phase nicht getrennt von einer Synchronisation betrachtet werden kann, muss diese weitere Differenzierung der möglichen Ursachen offen bleiben. Vorstellbar ist, dass sich in einer derart vulnerablen Zellzyklusphase wie der S-Phase auch die zelluläre Reaktion auf verschiedene äußere und innere Einflüsse verändert. Gezeigt wurde dies in anderer Richtung unter anderem anhand der Daten zur transkriptionellen Funktionseinschränkung von p53 nach der Applikation replikativen Stresses durch die Behandlung mit Gemcitabin in dieser Arbeit sowie durch die Applikation von Hydroxyurea in der Arbeit von Gottifredi (Gottifredi et al. 2001).

4.3 Mögliche Folgeexperimente

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Tumorsuppressors p53 während der ungestörten S-Phase untersucht. Im Folgenden werden mögliche Experimente vorgestellt, die geeignet erscheinen, die Ergebnisse weitergehend zu evaluieren.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in humanen Osteosarkomzellen (U2OS) durchgeführt, die zwei wildtypische Allele für p53 enthalten sowie p53-Spiegel, die mit denen humaner Fibroblasten vergleichbar sind und daher ein geeignetes System zur Untersuchung der p53-Funktion während einer ungestörten S-Phase darstellen (Diller et al. 1990; Niforou et al. 2008). Dennoch handelt es sich um eine Krebszelllinie, sodass eine Abweichung von normalen humanen Zellen in unterschiedlichen Bereichen der

Homöostase unweigerlich gegeben ist (s. dazu bspw. Hanahan und Weinberg 2000 sowie Hanahan und Weinberg 2011). Sinnvolle Folgeexperimente dieser Arbeit umfassen demnach insbesondere die Durchführung der hier beschriebenen Experimente auch in anderen Zelllinien sowie in primären, nicht-malignen Zellen. Dies könnten beispielsweise Fibroblasten sein. Durch die Ausweitung der Daten auf primäre Zellen würde sich die Aussagekraft der hier präsentierten Ergebnisse erhöhen, da letztlich die präventive Funktion des p53-Proteins in ungestörten Zellen weiter aufgeklärt werden soll. Interessant wäre in diesem Sinne auch eine Modifikation der Experimente: In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung der durch p53 hervorgerufenen zellulären Veränderungen die p53-Spiegel durch die Unterbrechung der Interaktion mit MDM2 auf nicht-genotoxische Weise angehoben. Um jedoch eine basale Funktion zum Schutz einer ungestörten Zelle vor genomischer Instabilität noch weitreichender beurteilen zu können, wäre in einem zweiten Schritt der Vergleich zwischen Zellen mit wildtypischem p53 und somit basaler Expression und Zellen ohne p53-Expression vorzunehmen. Da eine transkriptionelle Aktivität von p53 auch ohne detektierbaren Anstieg der zellulären Spiegel gezeigt wurde, erscheint es möglich, auch in einem solchen Versuchsansatz eine protektive p53-Funktion aufspüren zu können (Hupp et al. 1995).

Weiterhin könnte nach Beendigung der Replikation in den untersuchten Zellen die anschließende Mitose betrachtet werden, um die funktionellen Auswirkungen der erhöhten p53-Aktivität während der S-Phase auf den Zellzyklus näher bestimmen zu können, beispielsweise mittels durchflusszytometrischer Betrachtung. Dazu müsste die Nutlin-3 Inkubation zum Ende der S-Phase beendet und die Dauer der M-Phase, der Prozentsatz der erfolgten Mitosen sowie deren Regelhaftigkeit überprüft werden. In der Annahme einer positiven p53-Wirkung auf die Replikation mit erhöhter Effizienz derselben wären zwei mögliche Szenarien zu erwarten: Die Mitose könnte zum einen regulär ablaufen und keinen Unterschied der beiden Gruppen hervorbringen, somit allerdings darauf hindeuten, dass durch den Einfluss von p53 eine vollständige und reguläre Replikation stattgefunden hat. Ebenfalls möglich erscheint eine geringere Rate an fehlerhaften Mitosen in den Zellen, die unter verstärktem p53-Einfluss ihr Genom replizierten, um darauf hinzudeuten, dass das normale Ausmaß an Replikationsfehlern verringert worden wäre. Als Artefakt der experimentellen Prozedur in den vormals mit Nutlin-3 inkubierten Zellen wäre es allerdings auch denkbar, dass durch die nicht-physiologisch erhöhten p53-Spiegel mit konsekutiver Induktion der am G2/M-Arrest beteiligten Zielgene ein solcher Arrest das Eintreten der Zellen in die M-Phase verhindern könnte. Dieser Effekt würde durch den Vergleich wildtypischer Zellen mit p53-null-Zellen verhindert werden können.

Um die Vollständigkeit der Replikation unter dem Einfluss von p53 zu untersuchen, könnte zudem eine Karyotypisierung der Tochterzellen vorgenommen werden.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden Zellen während der S-Phase unter anderem mit Gemcitabin behandelt, das zu einem Stehenbleiben von Replikationsgabeln und somit zu replikativem Stress führt. Unter diesen Bedingungen zeigte sich p53 transkriptionell beeinträchtigt in Bezug auf das Zielgen *p21*. Dieser Effekt konnte größtenteils aufgehoben werden, wenn während der Inkubation mit Gemcitabin zusätzlich Nutlin-3 vorhanden war. Dennoch zeigte sich unter diesen Bedingungen eine Akkumulation von γH2AX als Marker replikativen Stresses. Interessant wäre eine genauere Untersuchung des Mechanismus, der dieses Resultat vermittelt. Möglicherweise liegt in den Zellen, die zusätzlich mit Gemcitabin inkubiert wurden, gleichzeitig schadensaktiviertes und nicht-schadensaktiviertes p53 vor, sodass beide p53-Varianten unterschiedliche Funktionen ausüben können.

Verschiedene Experimente wären unter dieser Fragestellung denkbar: So könnten beispielsweise über die Untersuchung der posttranskriptionellen Modifikationen des p53-Proteins zwei Gruppen mit unterschiedlicher Aktivierung identifiziert werden. Durch die Betrachtung der Replikation mittels Fiber Assays könnte zudem der unmittelbare Effekt der doppelten Behandlung auf die Replikationsgabeln erfasst werden, die unter Gemcitabin-Einfluss vermehrt stehenbleiben und unter Nutlin-3-Einfluss eine erhöhte Prozessivität aufweisen.

5 Zusammenfassung

Das Tumorsuppressorprotein p53 und sein Funktionsnetzwerk gehören zu den wichtigsten Mechanismen des Organismus, eine Zelle vor den Auswirkungen genotoxischen Stresses zu beschützen und somit ihre maligne Entartung zu verhindern. Zuletzt sind dank umfangreicher Forschungsarbeiten neue Erkenntnisse über die Beteiligung von p53 an verschiedensten zellulären Prozessen gewonnen worden, die weit über dessen Kernaufgaben Zellzyklusarrest, Seneszenzinduktion und Apoptoseeinleitung nach DNA-Schädigung hinausgehen.

Das Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es, die p53-Aktivität in einer ungestörten S-Phase zu charakterisieren, um mögliche Hinweise auf eine protektive *ex-ante*-Funktion zu erhalten, die DNA-Schäden verhindern kann anstatt lediglich *ex post* auf solche zu reagieren. Dazu wurden Zellen mit Hilfe eines doppelten Thymidin-Blocks synchronisiert. Erhöhte p53-Spiegel ließen sich durch die Anwendung von Nutlin-3 ohne genotoxischen Stress erzeugen. Durch qRT-PCR und mRNA-Sequenzierung konnte zunächst nachgewiesen werden, dass p53 in einer ungestörten S-Phase eine große Anzahl seiner Zielgene induzieren kann und somit grundsätzlich aktiv ist. Dies änderte sich durch eine genotoxische Behandlung mit Gemcitabin, unter der einzelne p53-Zielgene wie *p21* trotz Akkumulation von p53 nicht induzierbar waren. Zudem wurde anhand von durchflusszytometrischen Daten sowie mittels High-Content-Mikroskopie gezeigt, dass die Replikation trotz der Aktivierung von p53 durch Nutlin-3 im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zeitlich parallel abläuft und zu allen untersuchten Zeiten die Inkorporation von markierten Nukleotiden auch unter p53-Einfluss stattfindet. Die Replikationsrate war dabei über die Zeit konstant und geringer als in der Kontrolle.

Diese Ergebnisse weisen deutlich darauf hin, dass nicht-schadensaktiviertes p53 in der S-Phase eine basale Aktivität ausüben kann, die unabhängig von seiner DNA-Schadensantwort ist. Durch die Unterstützung einer exakten Replikation trägt es möglicherweise zum Erhalt der genomischen Integrität bei.

6 Literaturverzeichnis

Albrechtsen N, Dornreiter I, Grosse F, Kim E, Wiesmüller L, Deppert W (1999): Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. Oncogene 18, 7706

Anders S, Pyl PT, Huber W (2015): HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatics 31, 166–169

Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A (2018): How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? Cell Death Differ 25, 104

Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JKV, Hamilton S, Vogelstein B (1990): p53 Gene Mutations Occur in Combination with 17p Allelic Deletions as Late Events in Colorectal Tumorigenesis. Cancer Res 50, 7717–7722

Bartek J, Lukas J (2001): Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. Curr Opin Cell Biol 13, 738–747

Bartek J, Lukas C, Lukas J (2004): Checking on DNA damage in S phase. Nat Rev Mol Cell Biol 5, 792–804

Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, Campisi J (2003): Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. EMBO J 22, 4212–4222

Bieging KT, Mello SS, Attardi LD (2014): Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. Nat Rev Cancer 14, 359–370

Bond J, Haughton M, Blaydes J, Gire V, Wynford-Thomas D, Wyllie F (1996): Evidence that transcriptional activation by p53 plays a direct role in the induction of cellular senescence. Oncogene 13, 2097–2104

Bootsma D, Budke L, Vos O (1964): Studies on synchronous division of tissue culture cells initiated by excess thymidine. Exp Cell Res 33, 301–9

Bostock CJ, Prescott DM, Kirkpatrick JB (1971): An evaluation of the double thymidine block for synchronizing mammalian cells at the G1-S border. Exp Cell Res 68, 163–168

Brown JP, Wei W, Sedivy JM (1997): Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. Science 277, 831–834

Cha RS, Kleckner N (2002): ATR homolog Mec1 promotes fork progression, thus averting breaks in replication slow zones. Science 297, 602–606

Cho KR, Vogelstein B (1992): Genetic alterations in the adenoma–carcinoma sequence. Cancer 70, 1727–1731

Conti C, Saccà B, Herrick J, Lalou C, Pommier Y, Bensimon A (2007): Replication fork velocities at adjacent replication origins are coordinately modified during DNA replication in human cells. Mol Biol Cell 18, 3059–3067

d'Adda di Fagagna F (2008): Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. Nat Rev Cancer 8, 512

Danova M, Giordano M, Mazzini G, Riccardi A (1990): Expression of p53 protein during the cell cycle measured by flow cytometry in human leukemia. Leuk Res 14, 417–422

Diller L, Kassel J, Nelson CE, Gryka MA, Litwak G, Gebhardt M, Bressac B, Ozturk M, Baker SJ, Vogelstein B (1990): p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. Mol Cell Biol 10, 5772–5781

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Jr CAM, Butel JS, Bradley A (1992): Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. Nature 356, 215–221

Ewald B, Sampath D, Plunkett W (2007): H2AX phosphorylation marks gemcitabine-induced stalled replication forks and their collapse upon S-phase checkpoint abrogation. Mol Cancer Ther 6, 1239–1248

Fox MH, Read RA, Bedford JS (1987): Comparison of synchronized Chinese hamster ovary cells obtained by mitotic shake-off, hydroxyurea, aphidicolin, or methotrexate. Cytometry 8, 315–320

García-Alai MM, Tidow H, Natan E, Townsley FM, Veprintsev DB, Fersht AR (2008): The novel p53 isoform „delta p53" is a misfolded protein and does not bind the p21 promoter site. Protein Sci 17, 1671–1678

Gilbert DM, Neilson A, Miyazawa H, DePamphilis ML, Burhans WC (1995): Mimosine arrests DNA synthesis at replication forks by inhibiting deoxyribonucleotide metabolism. J Biol Chem 270, 9597–9606

Giono LE, Manfredi JJ (2006): The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. J Cell Physiol 209, 13–20

Gottifredi V, Prives C (2005): The S phase checkpoint: When the crowd meets at the fork. Semin Cell Dev Biol 16, 355–368

Gottifredi V, Shieh S, Taya Y, Prives C (2001): p53 accumulates but is functionally impaired when DNA synthesis is blocked. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 1036–1041

Gottlieb E, Vousden KH (2010): p53 Regulation of Metabolic Pathways. Cold Spring Harb Perspect Biol 2, a001040

Hanahan D, Weinberg RA (2000): The Hallmarks of Cancer. Cell 100, 57–70

Hanahan D, Weinberg RA (2011): Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 144, 646–674

Huang P (1998): Excision of mismatched nucleotides from DNA: a potential mechanism for enhancing DNA replication fidelity by the wild-type p53 protein. Oncogene 17, 261–270

Hupp TR, Lane DP (1994): Allosteric activation of latent p53 tetramers. Curr Biol 4, 865–875

Hupp TR, Sparks A, Lane DP (1995): Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. Cell 83, 237–245

Inga A, Storici F, Darden TA, Resnick MA (2002): Differential Transactivation by the p53 Transcription Factor Is Highly Dependent on p53 Level and Promoter Target Sequence. Mol Cell Biol 22, 8612–8625

Iwakuma T, Lozano G (2003): MDM2, An Introduction. Mol Cancer Res 1, 993–1000

Jackson JG, Pereira-Smith OM (2006): p53 Is Preferentially Recruited to the Promoters of Growth Arrest Genes p21 and GADD45 during Replicative Senescence of Normal Human Fibroblasts. Cancer Res 66, 8356–8360

Janus F, Albrechtsen N, Dornreiter I, Wiesmüller L, Grosse F, Deppert W (1999): The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. Cell Mol Life Sci 55, 12–27

Ji C, Marnett LJ, Pietenpol JA (1997): Cell cycle re-entry following chemically-induced cell cycle synchronization leads to elevated p53 and p21 protein levels. Oncogene 15, 2749–2753

Kaeser MD, Iggo RD (2002): Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 95–100

Kamihara J, Rana HQ, Garber JE (2014): Germline TP53 Mutations and the Changing Landscape of Li–Fraumeni Syndrome. Hum Mutat 35, 654–662

Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL (2013): TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. Genome Biol 14, R36

Kim E, Rohaly G, Heinrichs S, Gimnopoulos D, Meissner H, Deppert W (1999): Influence of promoter DNA topology on sequence-specific DNA binding and transactivation by tumor suppressor p53. Oncogene 18, 7310–7318

Klusmann I, Rodewald S, Müller L, Friedrich M, Wienken M, Li Y, Schulz-Heddergott R, Dobbelstein M (2016): p53 Activity Results in DNA Replication Fork Processivity. Cell Rep 17, 1845–1857

Kruse J-P, Gu W (2009): Modes of p53 Regulation. Cell 137, 609–622

Kubbutat MHG, Jones SN, Vousden KH (1997): Regulation of p53 stability by Mdm2. Nature 387, 299-303

Kunkel TA (1992): DNA replication fidelity. J Biol Chem 267, 18251–18254

Lane DP (1992): p53, guardian of the genome. Nature 358, 15-16

Lebofsky R, Heilig R, Sonnleitner M, Weissenbach J, Bensimon A (2006): DNA replication origin interference increases the spacing between initiation events in human cells. Mol Biol Cell 17, 5337–5345

Lee S, Elenbaas B, Levine AJ, Griffith J (1995): p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. Cell 81, 1013–1020

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998): Genetic instabilities in human cancers. Nature 396, 643-649

Levine AJ (1997): p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. Cell 88, 323–331

Levine AJ, Oren M (2009): The first 30 years of p53: growing ever more complex. Nat Rev Cancer 9, 749-758

Levine AJ, Tomasini R, McKeon FD, Mak TW, Melino G (2011): The p53 family: guardians of maternal reproduction. Nat Rev Mol Cell Biol 12, 259-265

Li R, Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B (1994): Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. Nature 371, 534-537

Li T, Kon N, Jiang L, Tan M, Ludwig T, Zhao Y, Baer R, Gu W (2012): Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell cycle arrest, apoptosis, and senescence. Cell 149, 1269–1283

Lin S-Y, Li K, Stewart GS, Elledge SJ (2004): Human Claspin works with BRCA1 to both positively and negatively regulate cell proliferation. Proc Natl Acad Sci 101, 6484–6489

Love MI, Huber W, Anders S (2014): Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol 15, a550

Maga G, Hübscher U (2003): Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. J Cell Sci 116, 3051–3060

Menendez D, Shatz M, Resnick MA (2013): Interactions between the tumor suppressor p53 and immune responses: Curr Opin Oncol 25, 85–92

Micco RD, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, Schurra C, Garre' M, Nuciforo PG, Bensimon A, et al. (2006): Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. Nature 444, 638-642

Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM (2003): p53 Has a Direct Apoptogenic Role at the Mitochondria. Mol Cell 11, 577–590

Mirzoeva OK, Petrini JHJ (2003): DNA Replication-Dependent Nuclear Dynamics of the Mre11 Complex1 1 NIH GM56888 and the DOE ER62859. Mol Cancer Res 1, 207–218

Montagnoli A, Tenca P, Sola F, Carpani D, Brotherton D, Albanese C, Santocanale C (2004): Cdc7 Inhibition Reveals a p53-Dependent Replication Checkpoint That Is Defective in Cancer Cells. Cancer Res 64, 7110–7116

Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, et al. (1998): p53 Activates the CD95 (APO-1/Fas) Gene in Response to DNA Damage by Anticancer Drugs. J Exp Med 188, 2033–2045

Mummenbrauer T, Janus F, Müller B, Wiesmüller L, Deppert W, Grosse F (1996): p53 Protein Exhibits 3'-to-5' Exonuclease Activity. Cell 85, 1089–1099

Nakano K, Vousden KH (2001): PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. Mol Cell 7, 683–694

Niforou KN, Anagnostopoulos AK, Vougas K, Kittas C, Gorgoulis VG, Tsangaris GT (2008): The proteome profile of the human osteosarcoma U2OS cell line. Cancer Genomics Proteomics 5, 63–77

Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA (2002): Toward Maintaining the Genome: DNA Damage and Replication Checkpoints. Annu Rev Genet 36, 617–656

Petermann E, Woodcock M, Helleday T (2010): Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 16090–5

Plunkett W, Huang P, Xu YZ, Heinemann V, Grunewald R, Gandhi V (1995): Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potentiation. Semin Oncol 22, 3–10

Qian Y, Chen X (2010): Tumor suppression by p53: making cells senescent. Histol Histopathol 25, 515–526

Rausch T, Jones D, Zapatka M, Stütz A (2012): Genome Sequencing of Pediatric Medulloblastoma Links Catastrophic DNA Rearrangements with TP53 Mutations. Cell 148, 59–71

Rhim JS (1988): Viruses, oncogenes, and cancer. Cancer Detect Prev 11, 139–149

Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V (2011): Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene. Genes Cancer 2, 466–474

Rohaly G, Chemnitz J, Dehde S, Nunez AM, Heukeshoven J, Deppert W, Dornreiter I (2005): A Novel Human p53 Isoform Is an Essential Element of the ATR-Intra-S Phase Checkpoint. Cell 122, 21–32

Rufini A, Tucci P, Celardo I, Melino G (2013): Senescence and aging: the critical roles of p53. Oncogene 32, 5129–5143

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990): The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. Cell 63, 1129–1136

Schorl C, Sedivy JM (2007): Analysis of Cell Cycle Phases and Progression in Cultured Mammalian Cells. Methods 41, 143–150

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997): Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. Cell 88, 593–602

Shan B, Xu J, Zhuo Y, Morris CA, Morris GF (2003): Induction of p53-dependent Activation of the Human Proliferating Cell Nuclear Antigen Gene in Chromatin by Ionizing Radiation. J Biol Chem 278, 44009–44017

Shechter D, Costanzo V, Gautier J (2004): ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. Nat Cell Biol 6, 648–655

Shibue T, Takeda K, Oda E, Tanaka H, Murasawa H, Takaoka A, Morishita Y, Akira S, Taniguchi T, Tanaka N (2003): Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. Genes Dev 17, 2233–2238

Soussi T, Wiman KG (2007): Shaping Genetic Alterations in Human Cancer: The p53 Mutation Paradigm. Cancer Cell 12, 303–312

Stengel A, Kern W, Haferlach T, Meggendorfer M, Fasan A, Haferlach C (2017): The impact of *TP53* mutations and *TP53* deletions on survival varies between AML, ALL, MDS and CLL: an analysis of 3307 cases. Leukemia 31, 705-711

Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA, et al. (2011): Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development. Cell 144, 27–40

Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K, Takei Y, Nakamura Y (2000): A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. Nature 404, 42-49

Terasima T, Tolmach L (1963): Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells. Exp Cell Res 30, 344–362

Valente LJ, Gray DHD, Michalak EM, Pinon-Hofbauer J, Egle A, Scott CL, Janic A, Strasser A (2013): p53 Efficiently Suppresses Tumor Development in the Complete Absence of Its

Cell-Cycle Inhibitory and Proapoptotic Effectors p21, Puma, and Noxa. Cell Rep 3, 1339–1345

Vassilev LT (2004): In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. Science 303, 844–848

Vousden KH (2000): p53: Death Star. Cell 103, 691–694

Vousden KH, Prives C (2009): Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. Cell 137, 413–431

Wang Y, Blandino G, Givol D (1999): Induced $p21^{waf}$ expression in H1299 cell line promotes cell senescence and protects against cytotoxic effect of radiation and doxorubicin. Oncogene 18, 2643–2649

Ward IM, Chen J (2001): Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-dependent Manner in Response to Replicational Stress. J Biol Chem 276, 47759–47762

White E (2016): Autophagy and p53. Cold Spring Harb Perspect Med 6, a026120

Xeros N (1962): Deoxyriboside control and synchronization of mitosis. Nature 194, 682–683

Yi L, Lu C, Hu W, Sun Y, Levine AJ (2012): Multiple Roles of p53-Related Pathways in Somatic Cell Reprogramming and Stem Cell Differentiation. Cancer Res 72, 5635–5645

You Z, Kong L, Newport J (2002): The Role of Single-stranded DNA and Polymerase α in Establishing the ATR, Hus1 DNA Replication Checkpoint. J Biol Chem 277, 27088–27093

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. *Matthias Dobbelstein*, der das Thema der vorliegenden Arbeit bereitgestellt hat und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Durch seine unkomplizierte und herzliche Betreuung war es möglich, in produktiver Arbeitsatmosphäre und mit viel Freude dieses Projekt zu verwirklichen.

Weiterhin möchte ich danken:
Sonja Krönung, die ihre ganze qRT-PCR-Erfahrung mit mir geteilt und dabei immer wertvolles Feedback gegeben hat.

Priyanka Saini für die Besprechung ihrer Analysen zur Dauer der S-Phase in U2OS-Zellen, die Hilfe bei der Erarbeitung des doppelten Thymidin-Blocks sowie für ihre Unterstützung bei der Durchführung der eindimensionalen FACS-Analyse. In allen Belangen des Labor-Alltags und darüber hinaus ist sie mir eine geschätzte Ansprechpartnerin gewesen und unsere zahlreichen Gespräche haben meine Zeit in der Arbeitsgruppe bereichert.

Franziska Schmidt, die mir die komplexe Arbeit mit dem BD-Pathway-Mikroskop beigebracht hat und zu allen Problemen einen guten Rat geben konnte.

Magdalena Wienken für die Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten und für ihre Hilfe bei allen Fragen technischer Natur.

Ina Klusmann dafür, dass wir unsere jeweiligen Projekte immer wieder miteinander besprochen und die Ergebnisse in einen Zusammenhang gebracht haben, um neue Ideen und Anregungen zu erhalten. Auch für ihre Unterstützung nach dem Abschluss meiner Arbeit im Labor möchte ich mich bedanken.

Norman Ertych für die Unterstützung bei der Durchführung der Duplex-FACS-Analyse.

Ich danke dem *Transkriptomanalyselabor Göttingen* für die Durchführung der RNA-Sequenzierung.

Zudem möchte ich mich bei *Veena Jagannathan, Yizhu Li, Ulrike Keitel, Kamila Sabagh, Antje Dickmanns, Claudia Buabe* und *Karola Metze* für die Unterstützung in allen weiteren Belangen des Laboralltags bedanken.

Zuletzt gilt mein Dank der *Studienstiftung des deutschen Volkes*, deren finanzielle und ideelle Förderung wesentlich dazu beigetragen hat, diese Arbeit zu ermöglichen.