Universitätsklinikum Ulm

Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Janni

Sektion Gynäkologische Onkologie

Leiterin Sektion Gynäkologische Onkologie: Prof. Dr. Lisa Wiesmüller

Die Rolle von p53 und dessen Isoformen beim rekombinations-assoziierten Bypass von Replikationsblockaden

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Finja Kristina Ronja Ragnhild Todt

Kiel

2021

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Lisa Wiesmüller
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Alexander Kleger
Tag der Promotion:	21.07.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis II

1 Einleitung 1

1.1 Das Protein p53 1

1.2 Die p53-Isoformen 2

1.3 Die direkte und indirekte Beeinflussung der Genomstabilität durch p53 4

1.4 Die homologe Rekombination und ihre Beeinflussung durch p53 5

1.5 Der neue rekombinations-assoziierte Bypass von Replikationsblockaden 6

1.6 Fragestellung 8

2 Material und Methoden 10

2.1 Material 10

2.2 Methoden 21

3 Ergebnisse 32

3.1 Die Beeinflussung der replikations-assoziierten Rekombination durch p53 und seine Isoformen 32

3.2 Die Assoziation von PCNA mit p53 und seinen Isoformen 34

3.3 Die Assoziation von POLι mit p53 und seinen Isoformen 36

3.4 Die Beeinflussung der DNA-Elongation durch p53 und seine Isoformen 38

3.5 Die Beeinflussung der DNA-Elongation durch p53 und seine Isoformen nach der Titration 43

4 Diskussion 47

4.1 Stimulationsverlust der Isoformen p53β und p53γ bei der replikations-assoziierten Rekombination 47

4.2 Reduzierte Assoziation von PCNA und den p53-Isoformen 49

4.3 Fehlende Assoziation von POLι und den p53-Isoformen 51

4.4 Verkürzte DNA-Elongation von p53 und seinen Isoformen 52

4.5 Die Isoformen p53β und p53γ und die Tumorgenese – Ein Ausblick 54

4.6 Schlussfolgerung 55

5 Zusammenfassung 57

6 Literaturverzeichnis 59

Danksagung 66

Lebenslauf 67

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
APS	Ammoniumpersulfat
BAX	Bcl2-assoziiertes Protein
BCA	Bicinchoninsäure
BLM	Bloom Syndrom Protein
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CldU	5-Chloro-2’-Deoxyuridine
CTD	C-Terminus-Regulationsdomäne
DAPI	4’,6-Diamidin-2-Phenylindol
DBD	DNA-bindende Domäne
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FACS	Fluorescence-activated Cell Sortin
FKS	Fetales Kälberserum

FLp53	full length p53
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HR	Homologe Rekombination
IdU	5-Iodo-2’-Deoxyuridine
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
KLS	Kernlokalisierungssignal
l	Liter
LB-Medium	Lysogeny Broth Medium
mol	Mol
mA	Milliampere
MDM2	Mouse Double Minute 2
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MMC	Mitomycin C
MRE11	Meiotic Recombination 11 Homolog
NHEJ	Nicht-homologe Endjoining
nm	Nanometer
OD	Oligomerisationsdomäne

p21	Protein 21
p53	Protein 53
p53wt	p53-Wildtyp
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
pBS	pBlueScript II KS +/-
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PLA	Proximity Ligation Assay
POL	Polymerase
POLι	Polymerase iota
PRD	Prolin-reiche Domäne
rpm	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophorese
sek	Sekunde
SEM	Standard Error of Mean
Ser	Serin
SMARCAL1	SWI/SNF-Related Matrix-Associated Actin-Dependent Regulator Of Chromatin Subfamily A-Like Protein 1
SR	spontane Rekombination
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	TRIS-Acetat-EDTA

TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline mit Tween20
TEMED	N,N,N’,N’-Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TP53	Tumorprotein 53 Gen
V	Volt
w/v	weight/volume
wt	Wildtyp
wt*EGFP*	Wildtyp-EGFP
ZRAND3	Zinc Finger RANBP2-Type Containing 3

1 Einleitung

1.1 Das Protein p53

Der Tumorsuppressor p53 wurde erstmals im Jahr 1979 von mehreren unabhängigen Forschungsgruppen entdeckt [27, 67, 72] und seine bemerkenswerte Rolle als Wächter des Genoms [68] ist der Ursprung langjähriger Forschungsarbeiten. Bei dem Verständnis von seiner Funktion als Transkriptionsfaktor sowie bei der Kontrolle des Zellzyklus, der Apoptoseinduktion und der DNA-Reparatur [44, 83] haben wir in den letzten Jahren einen enormen Wissenszuwachs erlangt. Es ist bekannt, dass eine Dysfunktion des Proteins eine wesentliche Rolle in der Entstehung von Karzinomen spielt [50, 78, 95]. Das Tumorsuppressorgen *TP53* ist das am häufigsten mutierte Gen in karzinösem Gewebe [52], seine Mutationen sind Inhalt vieler Forschungsarbeiten und sie stehen in direktem Zusammenhang mit der Entstehung diverser Erkrankungen. Trotzdem ist es bisher noch schwierig, die mutierten p53-Variationen mit einer gezielten Therapie sowie dem Outcome des Patienten in Zusammenhang zu bringen. Dies führt uns zu der Annahme, dass wir die Komplexität des Tumorsuppressors noch nicht vollständig verstanden haben.

Funktionell lässt sich das aus 393 Aminosäuren bestehende Protein p53 in drei strukturelle Abschnitte unterteilen, welche insgesamt sieben funktionelle Abschnitte enthalten [76] (Abbildung 2). Der erste Abschnitt, der als N-Terminus bezeichnet wird, beinhaltet die Transaktivierungsdomänen TAD I und TAD II zur Transkriptionsaktivierung vieler nachgeschalteter Gene, sowie für die Beteiligung an Protein-Protein-Interaktionen wie zum Beispiel mit dem Mouse Double Minute 2-Protein (MDM2) [24, 45, 66, 68], dem Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) [9] und unterschiedliche Polymerasen [15, 99]. Ebenfalls im N-Terminus findet sich die für antiproliferative Signalwege relevante Prolin-reiche Domäne (PRD) [96].

Die darauffolgende zentrale Domäne, auch DNA-bindende Domäne genannt (DBD), ist einerseits für eine sequenzspezifische Bindung von doppelsträngiger DNA bekannt [57, 83]. Andererseits konnte gezeigt werden, dass p53, meistens als Tetramer formiert, über die DBD sequenzunabhängig spezifische Sekundärstrukturen wie Holliday Strukturen oder dreisträngige DNA-Strukturen, wie sie in ähnlicher Form auch in der frühen Rekombination vorkommen, bindet [28, 29, 70]. Zusätzlich findet sich hier eine intrinsische 3’ - 5’ Exonuklease [7, 79], dessen mögliche Funktion im Rahmen von neueren

Forschungsergebnissen entschlüsselt werden konnte [42]. Mutationen der DBD und die dadurch bedingte Inaktivierung von p53 sind einer der häufigsten Gründe der Karzinomentstehung [51, 76, 94].

Der C-Terminus beinhaltet die Oligomerisierungsdomäne (OD) zur Bildung von Tetrameren. Das p53-Tetramer bildet die aktive Form des Proteins und hat eine 10- bis 100-fach höhere Affinität zur DNA-Bindung als p53-Monomere [8]. Auch die posttranslationale Modifikation von p53 ist an das Vorkommen von Oligomeren gekoppelt. Neben der DNA-Bindung ist die OD auch an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt [23]. Stommel et al. 1999 [91] entdeckten das ebenfalls im C-Terminus platzierte Kernlokalisierungssignal (KLS), das für die zelluläre Lokalisation des Proteins entscheidend ist.

Der letzte Abschnitt von p53 beinhaltet die C-Terminus-Regulationsdomäne (CTD) [69, 94]. Durch die CTD wird das Protein zur unspezifischen DNA-Bindung in Zusammenhang mit Schäden in der Erbinformation befähigt [2, 26, 69, 76]. Insgesamt hat der C-Terminus somit sowohl einen Einfluss auf die Proteinstruktur, die Lokalisation sowie auf die DNA-Bindungsfähigkeit.

1.2 Die p53-Isoformen

Das Tumorsuppressorgen *TP53* liegt auf Chromosom 17p13.1 und enthält 11 Exons (Abbildung 1) [52]. Durch das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Promotoren sowie durch alternatives Splicen und Variationen bei der Translation codiert das *TP53*-Gen neben dem FLp53 (full length), auch Wildtyp genannt (p53wt), für 11 weitere Isoformen [60, 75].

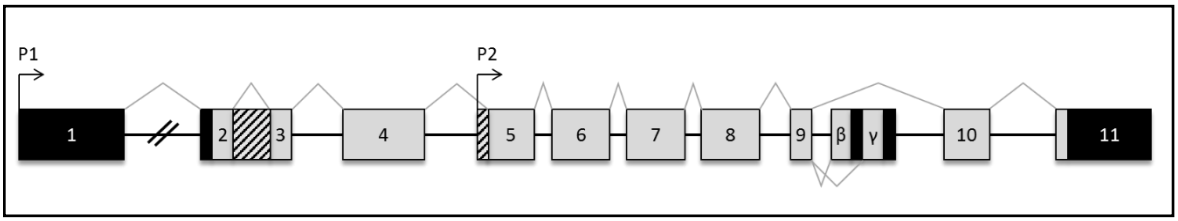

Abbildung 1 **Schematische Darstellung des *TP53*-Gens mit seinen 11 Exons**

Codierende Exons sind in grau, nicht codierende Exons sind in schwarz dargestellt. Gestreifte Boxen werden nicht translatiert. Die Größe der Exons ist repräsentativ und nicht proportional zur wirklichen Größe der Exons. Promotor 1 (P1) codiert für das vollständige p53wt (Wildtyp) sowie für die Δ40p53 Isoformen. Promotor 2 (P2) codiert für Δ133p53- und Δ160p53-Isoformen. Durch alternatives Splicen von Exon 9 entstehen die β- und γ-Isoformen.

Aus dem Transkript von Promotor 1 entstehen sowohl das vollständige p53wt als auch unter Verwendung einer internen ribosomalen Eintrittsstelle die Isoform Δ40p53 mit

verkürztem N-Terminus. Unter Aktivierung des internen Promotors 2 entstehen ebenfalls Proteine mit verkürztem N-Terminus, hier jedoch ausgehend vom Codon 133 bzw. 160, genannt Δ133p53 bzw. Δ160p53 [21, 74].

Aus alternativem Splicen des neunten Exons resultieren die Isoformen mit verkürztem C-Terminus p53β und p53γ. An Stelle der OD und der CTD finden sich hier 10 beziehungsweise 15 zusätzliche Aminosäuren [94]. Ein veränderter C- und N-Terminus kann auch kombiniert auftreten. So entstehen die Isoformen Δ40p53β, Δ40p53γ, Δ133p53β, Δ133p53γ, Δ160p53β und Δ160p53γ.

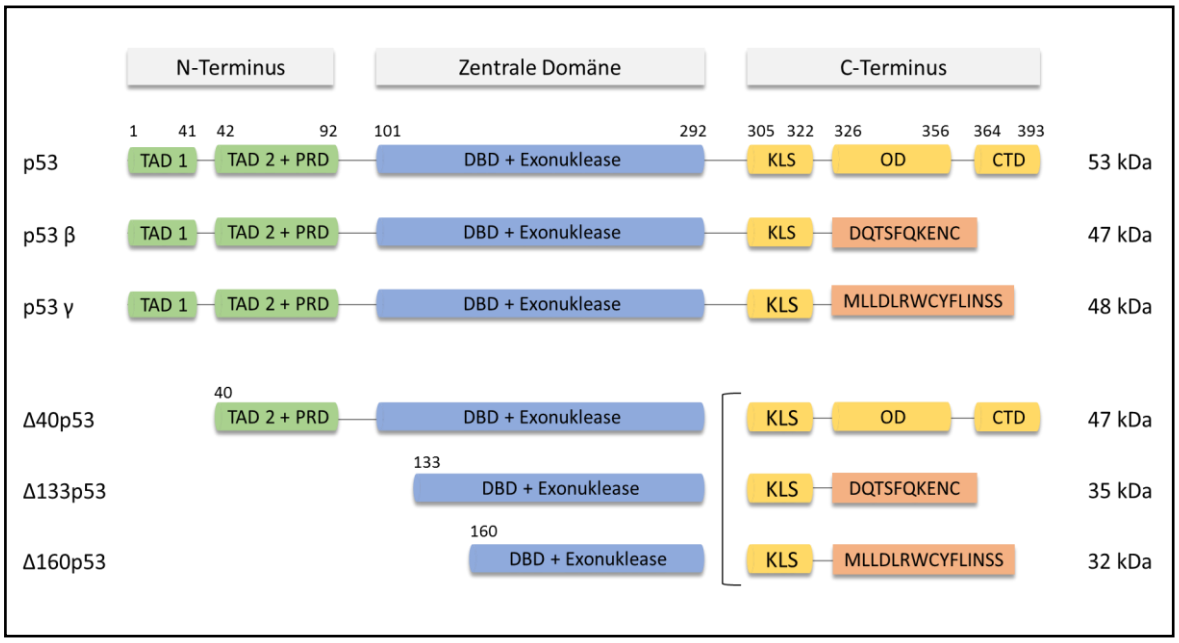

***Abbildung* 2 Schematische Darstellung des Proteins p53 und dessen Isoformen**

Die Proteine p53, p53β und p53γ sind vollständig dargestellt. Die alternativen C-Termini der Isoformen Δ40p53, Δ133p53 und Δ160p53 sind mit der Klammer zusammengefasst. Transaktivierungdomäne 1 und 2 (TAD 1 + 2), Prolin-reiche Domäne (PRD), DNA-bindende Domäne (DBD), Kernlokalisierungsdomäne (KLS), Oligomerisierungsdomäne (OD), C-Terminus-Regulationsdomäne (CTD). Der alternative C-Terminus der β- und γ-Isoformen ist in roten Boxen dargestellt. Angabe der Aminosäurennummerierung oberhalb der Proteine. Angabe der Molekularmassen der Proteine mit vollständigem C-Terminus in Kilodalton (kDa).

Das Vorkommen der Isoformen ist je nach Zelltyp und Gewebeart unterschiedlich und wird sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationaler und posttranslationaler Ebene reguliert [52]. Neben dem regelhaften Vorkommen in gesundem Gewebe zeigte sich bei Tumorpatienten häufig ein verändertes Proteinexpressionslevel, was eine Mitbeteiligung bei der Karzinogenese vermuten lässt [6, 20, 52]. Es fanden sich jedoch auch Hinweise darauf, dass das Vorhandensein bestimmter Isoformen einen positiven Einfluss auf die Prognose von Krebspatienten haben kann [47].

Weiterführend ist bekannt, dass die Isoformen auf das gleiche Stresssignal unterschiedliche Reaktionen der Zelle triggern [52]. So kristallisierte sich mit der Zeit heraus, dass ein balanciertes Expressionslevel der Protein-Isoformen einen immensen Einfluss auf die durch p53 getriggerte zelluläre Antwort auf Stresssignale hat. Das heißt, auch die Isoformen steuern Mechanismen wie den Zellzyklus, die Apoptose, die Seneszenz, die Differenzierung der Stammzellen und nicht zuletzt die Karzinogenese. Die Entschlüsselung des „p53-Isoformen-Codes“ [52] verspricht neue Erkenntnisse über die Therapie von Tumorerkrankungen, degenerativen Erkrankungen und Alterung.

1.3 Die direkte und indirekte Beeinflussung der Genomstabilität durch p53

Der Tumorsuppressor p53 ist primär bekannt als Transkriptionsfaktor. Ausgelöst durch gentoxischen Stress wird er aktiviert und akkumuliert in der Zelle, welche durch zwischengeschaltete Mediatoren in den Zellzyklusarrest oder bei irreparablen Schäden in die Apoptose überführt wird. Ein entstandener DNA-Schaden kann im Zellzyklusarrest repariert werden, der Organismus ist vor fehlerhafter DNA-Replikation geschützt und die Integrität der Erbinformation bleibt erhalten [4, 44, 71].

Neuere Daten legen nahe, dass das Protein p53 mit einem weiteren transkriptionsunabhängigen Mechanismus für den Erhalt der Genomstabilität sorgt. Dieser Mechanismus wird in der Literatur auch als „Basisfunktion“ von p53 bezeichnet [4]. Ein Beispiel hierfür stellt die direkte Interaktion von p53 mit Faktoren der DNA-Reparaturmechanismen, wie die der Basen- und Nukleotidexzisionsreparatur, der nichthomologen Endverknüpfung sowie der homologen Rekombination dar [4, 12, 86]. Sowohl die biochemischen Eigenschaften der zentralen Domäne von p53, wie die sequenz- und sekundärstrukturspezifischen DNA-Bindungsfähigkeiten als auch die Exonukleasefunktion lassen auf eine direkte Beteiligung bei der Beseitigung von endogenen DNA-Schäden schließen [4].

Wie genau das Protein p53 transkriptionsunabhängig die Genomstabilität beeinflusst, ist im Detail noch nicht verstanden. Mit der Entdeckung der intrinsischen Exonukleasefunktion des Proteins durch Mummenbrauer et al. [79] und der Entschlüsselung der biologischen Bedeutung bei der Überwindung von Replikationsblockaden durch Stephanie Biber (Hampp) [41, 42], haben wir jedoch erste Einblicke in einen genomstabilisierenden Mechanismus erhalten.

1.4 Die homologe Rekombination und ihre Beeinflussung durch p53

Doppelstrangbrüche (DSB) stellen einen der schwerwiegendsten DNA-Schäden dar. Sie können physiologisch bei der DNA-Replikation entstehen oder durch äußere Faktoren wie ionisierende Strahlung ausgelöst werden. Um dem Zelltod zu entgehen und die Genomstabilität aufrecht zu erhalten, gibt es hierfür spezialisierte Reparaturmechanismen. Im Rahmen von DSB sind dies die homologe Rekombination (HR) und das nichthomologe Endjoining (NHEJ). Die Wahl des Mechanismus ist unter anderem abhängig vom Zellzyklus [90]. So wird bei der HR zur Reparation das homologe Schwesterchromatid verwendet, welches vor allem in der S-Phase des Zellzyklus zugängig ist. Hierdurch ist im Gegensatz zum NHEJ eine weitestgehend fehlerfreie Rekonstruktion möglich [12].

Im Zusammenhang mit p53 konnte gezeigt werden, dass die HR beim Auftreten von zellulärem Stress durch DSB deutlich frequenzgemindert wird. Fehlt das Protein oder ist es mutiert, resultiert dies wiederum in einer massiv gesteigerten HR [11, 77, 97]. Dies spricht für eine von p53 vermittelte Schutzfunktion der Zelle vor der Vermehrung fehlerhafter DNA-Rearrangements und geschieht vorwiegend transkriptionsunabhängig [5, 30, 86].

Unter physiologischen Bedingungen läuft die HR als sogenannte spontane Rekombination (SR) ab. Restle et al. 2008 [81] konnten erstmals beweisen, dass p53 auch eine Steigerung der SR-Rate bewirkt. Bei der Untersuchung der Frage nach der Regulation von sowohl inhibitorischen als auch stimulierenden Kaskaden zeigte sich die posttranslationale Phosphorylierung von p53 als entscheidendes Stellrad [81].

Die SR dient zur Überwindung von endogenen Replikationshindernissen, ihre Funktion wird aber auch im Rahmen der PARP-Inhibition und bei der Beseitigung der dabei entstehenden PARP-DNA-Komplexen diskutiert. 2014 konnte im Labor meiner Dissertationsbetreuerin Prof. Dr. Lisa Wiesmüller gezeigt werden, dass die p53-vermittelte Steigerung der SR-Rate mit einer erhöhten Resistenz gegenüber PARP-Inhibitoren sowie einer Verringerung der DNA-Schäden verknüpft werden kann [49]. Hier bestätigte sich demnach die in der Literatur bereits vermutete „Healer“-Funktion von p53, welche p53 eine protektive Rolle zuweist [40, 88].

Dieses Phänomen nahm Stephanie Biber unter der Leitung von Prof. Dr. Lisa Wiesmüller zum Anlass ihrer Forschungsarbeit und beleuchtete nicht nur die Interaktion von p53 und der SR-Stimulation näher, sie präsentiert auch einen so bisher noch nicht bekannten Weg

zur Überwindung von DNA-Schäden während der Replikation [41, 42]. Dies ist ein wichtiger Beitrag zum Verständnis, wie p53 als direkter Modulator das Genom vor malignen Veränderungen bewahrt.

1.5 Der neue rekombinations-assoziierte Bypass von Replikationsblockaden

Die Replikation ist ein hochkomplexer Prozess und erfordert das exakte Zusammenspiel zahlreicher Faktoren, um die DNA fehlerfrei zu duplizieren. Replikativer Stress führt zu Zellzyklusstörungen und zur Blockade der Replikationsgabel bis hin zu einem Abbruch der Replikation mit daraus entstehenden DSB. Das Auflösen dieser Blockaden ist daher ein wichtiger Beitrag zum Schutz vor Mutationen und der Karzinogenese. Im Rahmen ihrer Doktorarbeit [41] beleuchtete Stephanie Biber diesen komplexen Mechanismus genauer und erbrachte neue Erkenntnisse über p53 und den Erhalt der Genomstabilität.

Zunächst untersuchte Stephanie Biber unter Verwendung von p53wt und p53H115N mit fehlender Exonukleasefunktion bei noch vorhandener Transkriptionsfähigkeit [1] die Stimulation der spontanen Rekombination. Hierbei zeigte sich eine Abhängigkeit der Stimulation von der Exonukleasefunktion. Die Versuchsreihe mit p53H115N zeigte keine Steigerung der Rekombinationsfrequenz. Darüber hinaus wurde durch das jeweilige Ausschalten von der E3-Ubiquitin-Protein-Ligase RAD18, dem Helikase-like-Transkriptionsfaktor (HLTF), der Endonuklease und Translokase ZRANB3 (Zinc Finger RANBP2-Type Containing 3) und der Polymerase ι (POLι) die Rekombinationsfrequenz ebenfalls deutlich reduziert, womit sich eine Beteiligung am Rekombinationsprozess beweisen ließ [42]. Unter Zusammenschau der erlangten Erkenntnisse konnte ein neuartiger Bypass von Replikationsblockaden entschlüsselt werden, welcher in Abbildung 3 im Detail abgebildet ist.

Wird ein Replikationshindernis detektiert, folgt die Rekrutierung von p53 und das Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) wird durch RAD18 monoubiquitiniert [34, 54]. Hierdurch kommt es zur Komplexbildung von p53 mit POLι [42]. Dieser Schritt zeigt sich wieder als exonukleaseabhängig, da er unter Verwendung von p53H115N nicht reproduzierbar ist. Aus dieser Erkenntnis abgeleitet ist die Vermutung, dass durch die p53-assoziierte Exonuklease und POLι ein Leerlauf entsteht, ähnlich wie dies in der Literatur bereits für andere Polymerasen und deren Proofreading-Exonuklease beschrieben wurde [42, 58]. Durch POLι wird der DNA-Strang um ein Nukleotid erweitert,

anschließend jedoch durch die Exonuklease direkt wieder verkürzt. Dies führt einerseits zur Stabilisierung der Replikationsgabel, andererseits wird das Fortschreiten der Replikation verlangsamt. Als nächsten Schritt kommt es mittels HLTF zur Polyubiquitinierung von PCNA und konsekutiv zur Bindung von ZRANB3. ZRANB3 und HLTF stabilisieren gemeinsam die Replikationsgabel durch Regression der Gabel mittels Paarung der neusynthetisierten Stränge und bewirken nach Beseitigung des Hindernisses einen Neustart der Replikation [17, 25]. Dies zeigt, wie p53 die SR stimuliert und Replikationsblockaden mithilfe seiner Exonukleasefunktion, POLι, PCNA, RAD18, HLTF und ZRANB3 überwindet.

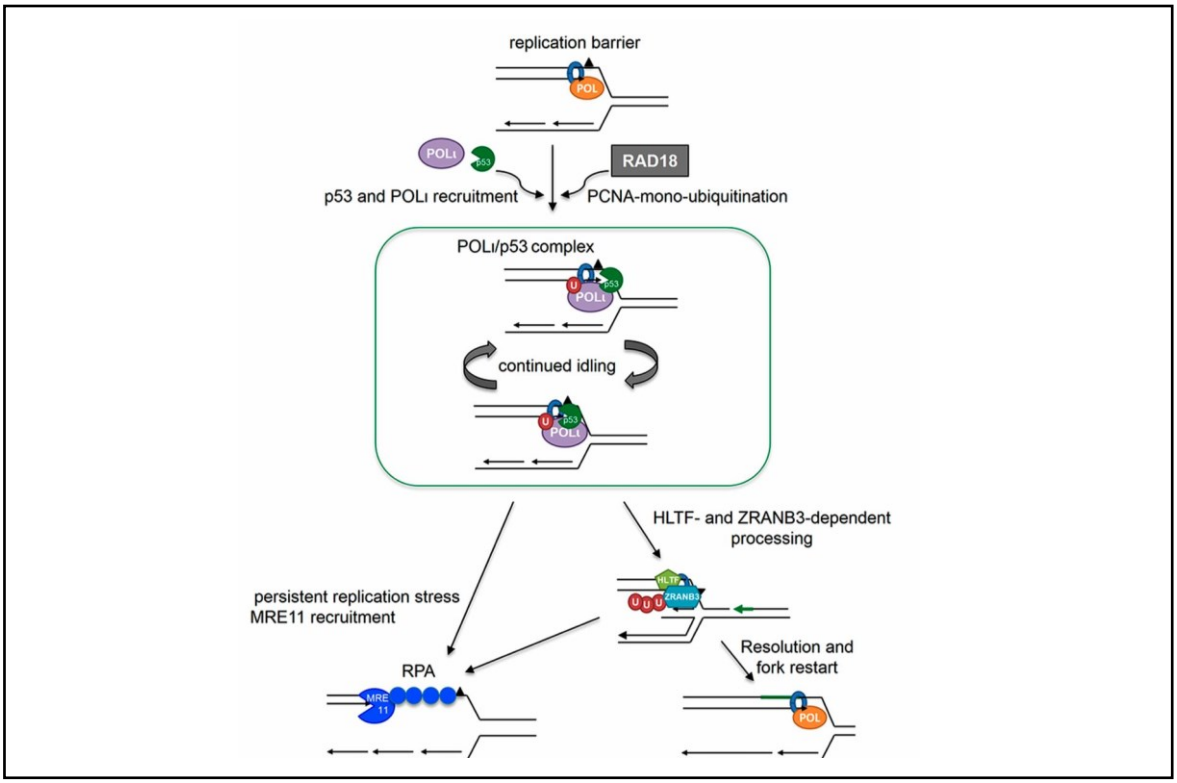

Abbildung 3 **Modell des p53-vermittelten Bypass von Replikationsblockaden mittels Rekombination**

Durch die Detektion einer Replikationsblockade stoppt das Replisom. PCNA (Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen), als blaue Ringstruktur dargestellt, wird durch die E3-Ubiquitin-Protein-Ligase RAD18 monoubiquitiniert (U) und sowohl p53 als auch POLι (Polymerase iota) werden rekrutiert. Durch die Polymerasefunktion von POLι und der Exonukleasefunktion von p53 kommt es zum Leerlauf („Idling“). PCNA wird polyubiquitiniert und HLTF (Helikase-like-Transkriptionsfaktor) und ZRANB3 (Zinc Finger RANBP2-Type Containing 3) generieren den Neustart der Replikationsgabel [42]. Auf die Überwindung von Replikationsblockaden mittels MRE11 (Meiotic Recombination 11) und RPA (Replikationsprotein A) wird in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen. Abbildung: Model for p53-mediated resolution of replication barriers von Hampp et al. 2016 [42]. Lizenz: CC BY-NC 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

1.6 Fragestellung

Mittlerweile ist uns der Mechanismus, wie p53 einen direkten Einfluss auf die Stabilität des Genoms nehmen kann, besser bekannt als noch vor wenigen Jahren. Wir haben gelernt, dass p53 mit seiner Exonukleasefunktion, POLι und weiteren bereits genannten Faktoren das Fortfahren der Replikation mittels Bypass initiiert. Uns ist jedoch noch nicht bekannt, wie die Faktoren miteinander interagieren und ob oder wie die unterschiedlichen Isoformen von p53 an der Replikationsgabel agieren.

1.6.1 Können die p53-Isoformen wie p53wt die spontane Rekombination stimulieren?

Interessanterweise stimuliert p53 die SR [18, 19, 36, 81], wodurch endogene Replikationsblockaden überwunden werden können und so ein Beitrag zum Erhalt der Genomstabilität geleistet wird. Um diesen Mechanismus genauer zu untersuchen, testete ich mittels Messung der Rekombinationsfrequenz des vollständigen Wildtyps von p53 und seinen Isoformen, ob und wenn ja, welche der Isoformen noch die Fähigkeit zur Stimulation besitzen, um so deren Bedeutung unter physiologischen und pathologischen Bedingungen besser einschätzen zu können, aber auch um Näheres über die beteiligten funktionellen Domänen des Proteins p53 zu erfahren, welche in der jeweiligen Isoform fehlen.

Zum Messen der Rekombinationsfrequenz wird ein in unserer Arbeitsgruppe entwickeltes Verfahren benutzt, welches auf der Rekonstruktion von fluoreszierendem *EGFP* beruht [3]. Hierfür wurden K562 Zellen mit integriertem Plasmid (HR-*EGFP*/3'*EGFP*) verwendet. Das Plasmid besteht aus einem HR-*EGFP*-Akzeptorgen, einem Spacer und einem 3'*EGFP*-Donorgen. Durch die SR kommt es zum genetischen Austausch zwischen Donor- und Akzeptorgen und damit zur *EGFP*-Rekonstruktion. Die Zelle produziert nun fluoreszierendes Wildtyp-*EGFP* (wt*EGFP*). Dies lässt sich mithilfe der Durchflusszytometrie messen.

1.6.2 Die Interaktion von PCNA und POLι mit p53 und seinen Isoformen

Um die beim Bypass von Replikationsblockaden beteiligte direkte Interaktion von p53 mit Replikations-Cofaktoren wie PCNA und POLι zu verbildlichen, bietet sich der *in situ* Proximity Ligation Assay (PLA) an, der Protein-Protein-Assoziationen detektiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl PCNA wie auch POLι direkt mit p53pSer15, das in Zusammenhang mit gestoppten Replikationsgabeln steht, interagieren [42]. Diese und weitere Proteine kommunizieren zumeist, jedoch nicht ausschließlich mit dem N-Terminus

von p53, wie Abbildung 4 zeigt. Ob jedoch allein das Vorhandensein eines intakten N-Terminus für diese Assoziation ausreichend ist, oder ob weitere Eigenschaften benötigt werden, wie die Fähigkeit zur Tetramerbildung oder zur Proteinassoziationen über die OD, soll in dieser Arbeit mittels PLA von p53-Isoformen mit PCNA und POLι untersucht werden.

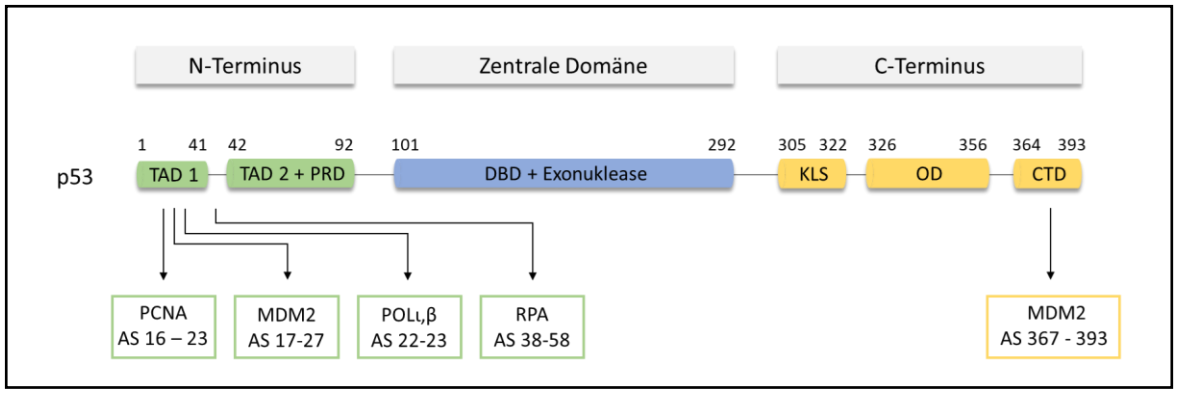

Abbildung 4 **Schematische Darstellung des Proteins p53 und seiner potenziellen Bindungspartner**

Gezeigt ist das Protein p53wt (Wildtyp) mit seiner Unterteilung in die einzelnen Domänen: Transaktivierungdomäne 1 und 2 (TAD 1 + 2), Prolinreiche Domäne (PRD), DNA-bindende Domäne (DBD), Kernlokalisierungsdomäne (KLS), Oligomerisierungsdomäne (OD), C-Terminus-Regulationsdomäne (CTD). Angabe der Aminosäurennummerierung oberhalb des Proteins. Unterhalb findet sich eine Auswahl an p53-Bindungspartnern wie PCNA (Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen) [9], MDM2 (Mouse Double Minute 2) [24, 66, 80], POLι (Polymerase iota) [15] und POLβ (Polymerase beta) [99] sowie RPA (Replikationsprotein A) [85] unter Angabe ihrer Aminosäuren-Bindungsstelle (AS). Abbildung nach [15]. Lizenz: CC BY-NC 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

1.6.3 Der Bypass von Replikationsblockade

Stephanie Biber konnte zeigen, dass das Überwinden von Replikationsblockaden zu einer Verlangsamung der Replikation führt. Zur Quantifizierung wurde der DNA-Fiber-Spreading-Assay verwendet, wodurch die p53-abhängige Verlangsamung der DNA-Elongation während der Replikation festgehalten wurde [42]. Eine mögliche Erklärung stellt der beschriebene Leerlauf der Nukleotidpolymerisation dar.

In dieser Arbeit untersuche ich das Verhalten der p53-Isoformen im DNA-Fiber-Spreading-Assay, um zu beobachten, ob es auch hier zu einer verzögerten DNA-Elongation kommt. Dies würde dafürsprechen, dass es den Isoformen wie dem p53wt möglich ist, einen Polymerisationsleerlauf zu generieren und die Zelle so einen Replikationsbypass durchführen kann. Sollten spezifische Isoformen diese Funktion verloren haben, gibt uns dies Aufschluss über die benötigten funktionellen Domänen des Proteins p53 beim Replikationsbypass.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Analysewaagen:	
BP3100 S	Sartorius, Göttingen, DE
BP61	Sartorius, Göttingen, DE
ChemiDoc MP Imaging System	BioRAD, Hercules, USA
Elektrophorese Power Supply:	
EPS 1000	Amersham Pharmacis Biotech, Freiburg, DE
EPS 1001	Amersham Bioscience, Piscataway, USA
EPS 2A 200	Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco CA, USA
FACS Calibur™ Flow Cytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Gelgießkammer	Hoefer, San Francisco, USA
GenePulser Xcell	Bio-Rad, Burladingen, DE
Inkubatoren:	
Forma™ CO_2-Inkubator 3164 S/N	Forma Scientific, Inc., Ohio, USA
Inkubator B6760, Heraeus Instruments	Thermo Scientific, Hanau, DE
Magnetrührer:	
IKA-Combimag RCT	Janke & Kunkel GmbH &Co.KG, Staufen im Braisgau, DE
IKAMAG® RO	Janke & Kunkel GmbH &Co.KG, Staufen im Braisgau, DE
Mighty Small Transfer Tank TE22	Hoefer Inc., Richmond CA, USA
Mikroskope:	
Fluoreszenzmikroskop Biorevo BZ9000	Keyence, Neu-Isenburg, DE
Lichtmikroskop Olympus IX50-S8F	Olympus, Tokyo, Japan
Mikrotiterplatte-Photometer Sunrise™	Tecan Trading AG, Schweiz
NanoDrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Scientific, Erlangen, DE

Tabelle 1: Geräte

Neubauer-Zählkammer	
RunOne™ Electrophoresis Unit	Embitec, San Diego, USA
Schüttelapparate:	
Phero-Shaker	Biotec-Fischer, Reiskirchen, DE
Certomat MO II	Sartorius, Göttingen, DE
Certomat R	B. Braun Biotech International, Melsungen, DE
Scotsman AF 100 Eismaschine	Scotsman Ice System, Suffolk, UK
Sterilbank Clean Air DLF/BSS6	Clean Air Techniek, Woerden, NL
Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Varioklav Dampfsterilisator 75S	H+P, Oberschleißheim, DE
Vertical Electrophoresis Unit SE250	Hoefer Pharmacis Biotech Inc., San Francisco, USA
VortexGenie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, N.Y., USA
Wasserbäder:	
3048	Köttermann, Uetze/ Hänigsen, DE
1004	Gemeinschaft für Labortechnik, Burgwedel, DE
Zentrifugen:	
Biofuge pico	Kendro, Osterode, DE
Multifuge 1_{S-R}	Haraeus-Sepatech, Osterode, DE
Multifuge 3_{S-R}	Haraeus-Sepatech, Osterode, DE
Cytospin 3 Zentrifuge	Shandon, Bohemia, USA
Biofuge 13	Haraeus-Sepatech, Osterode, DE

2.1.2 Software

Tabelle 2: Software

GraphPad Prism Software 6/7/8	GraphPad Software Inc., La Jolia, USA
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Image LabTM Software	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Magellan3	Tecan, Crailsheim, DE
BZ-II Analyzer	Keyence Software, Germany GmbH, Neu-Isenburg, DE
BD Cell Quest TM Pro 5.2.1	BD Biosciences, Heidelberg, DE

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Acrylamid (30:0,8)	National Diagnostics, Atlanta, USA
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Bacto Trypton	Becton dickinson, Sparks, USA
Bacto Yeast extract	Becton dickinson, Sparks, USA
Bovine Serum A (BSA)	New England Biolabs, Frankfurt/M., DE
β-Mercaptoethanol	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
ddH_2O	Universität Ulm, DE
4’,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, DE
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Invitrogen, DE
Ethylenediamintetraacetic acid (EDTA)	Applichem, Darmstadt, DE
Essigsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Eisessig	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, Seelze, DE
FACS-Clean	Becton-Dickinson, Heidelberg, DE
FACS-Flow	Becton-Dickinson, Heidelberg, DE

Tabelle 3: Chemikalien

FACS-Rinse	Becton-Dickinson, Heidelberg, DE
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Pasching, AT
Formaldehyd 37%	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Gene Ruler™ DNA-Ladder-Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Goat Serum	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Glycerol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
HCl (Salzsäure)	Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Seelze, DE
Lysispuffer-Stock	Universität Ulm, DE
Methanol	Universität Ulm, DE
Milk Powder	Marvel Premier Foods Ltd., Long Sutton, UK
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Mowiol 4-88	Calbiochem, Darmstadt, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt, DE
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Nonidet P40	Fluka, Neu-Ulm, DE
PBS 10x (Phosphate Buffered Saline)	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, DE
PBS 1x	PAA, Pasching, DE
Penicillin-Streptomycin-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Ponceau-S-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Protease-Inhibitor Cocktailtabletten	Roche, Mannheim, DE
Rotiphorese 10x SDS Page-Puffer	Roth, Karlsruhe, DE
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)	PAA, Pasching, DE
SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Rockford, USA
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe, DE
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

Tabelle 3: Chemikalien

Tris/HCl	Roth, Karlsruhe, DE
Trizma Base (Tris)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Tween20	Merck, Darmstadt, DE

2.1.4 Sets

Tabelle 4: Sets

Chemilumineszenz Substrate	
Super Signal® West Pico	Thermo Scientific, Rockford, USA
Super Signal® Dura Extended Duration	Thermo Scientific, Rockford, USA
Duolink® *In Situ* Orange Starter Kit	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
HiMark Pre-Stained HMW Protein Standard	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Gene Ruler™ DNA-Ladder-Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Page Ruler™ Pre-Stained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
PowerPrep™ HP Plasmid Maxiprep System	Marligen Biosciences Inc., Ijamsville, USA
Western-Blot-Stripping-Puffer	Perbio Science, Bonn, DE

2.1.5 Weitere Materialien

Tabelle 5: Weitere Materialien

Biosphere SafeSeal Tube (2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Elektroporationsküvetten (0,4 mm)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
FACS-Rundbodenröhrchen (5 ml)	Becton-Dickinsin, Heidelberg, DE
Filterpapier Whatman (3 mm)	Schleicher und Schüll, Dassel, DE
Hybond-C-Extra, Nitrocellulose	Amersham Biosciences, Freiburg, DE
Objektträger Superfrost Plus Gold	Thermo Scientific, Rockford, USA
Reaktionsgefäße (0,5 ml/ 1,5 ml/ 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
TC-Flaschen (25cm^2/75cm^2/175cm^2)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
TC-Platte 6 Well / 96 Well	Sarstedt, Nümbrecht, DE

2.1.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

5% BSA (Bovines Serumalbumin)	2g	Bovine Serum
	40 ml	1x PBS (Phosphate Buffered Saline)
Fixierlösung (Fiber)	37,5 ml	Methanol
	12,5 ml	Acetic Acid
Goat Serum	500 µl	Goat Serum
	9,5 µl	PBS
10x High-molecular-weight (HMW-Puffer)	495 mmol	Triszma Base
	400 mmol	Glycin
Lysispuffer (Fiber)	0,5%	SDS (Natriumdodecylsulfat)
	200 mmol	Tris-HCL (pH 7,4)
	50 mmol	EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäure)
PBS-Triton	900 ml	Aqua dest
	100 ml	10x PBS
	5 ml	Triton x100
0,05% PBS-Tween	900 ml	Aqua dest
	100 ml	10x PBS
	0,5 ml	Tween 20
6x SDS	350 mmol	Tris-HCl (pH 6,8)
	9,3% (w/v)	DTT
	10% (w/v)	SDS
	36% (v/v)	Glycerol
	0,6% (w/v)	Bromphenolblau
	5%	β-Mercaptoethanol
4x SDS Sammelgelpuffer	0,5 mol	Tris-HCl (pH 6,8)
	0,4%	SDS
4x SDS Trenngelpuffer	1,5 mol	Tris-HCl (pH 8,8)
	0,4%	SDS

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

50x TAE-Puffer	2 mol	Triszma Base
(TRIS-Acetat-EDTA-Puffer)	1 mol	Eisessig
	0,1 mmol	EDTA
		pH 8,3
TBS 20 x	20 mmol	Tris-HCl (pH 7,6)
(Tris-buffered saline)	137 mmol	NaCl
TBS-T	950 ml	Aqua dest
(Tris-buffered saline with Tween20)	50 ml	20 x TBS
	1 ml	Tween 20
TE-Puffer	10 mmol	Tris-HCl
(Tris-EDTA-Puffer)	1 mmol	EDTA
		pH 8,0
Zell-Lysispuffer (Western Blot)	2,5 ml	Lysis-Stock
	7,5 µl	Nonidet P40 (100%)
	¼ Tablette	Proteaseinhibitor

2.1.7 Kulturmedien

Tabelle 7: Kulturmedien

LB-Bakterienkultur-Medium	10 g	Bacto Trypton
(Lysogeny Broth Medium)	5 g	Bacto Yeast-Extract
	10 g	NaCl
	1 l	ddH_2O
		pH 7,4
LB-Agar	15 g	Bacto Agar
	1 l	LB-Medium
RPMI-Medium für Suspensionszellen	500 ml	RPMI 1640
(Roswell Park Memorial Institute)	75 ml	FKS (Fetales Kälberserum)
	6 ml	Penicillin-Streptomycin-Glutamin
DMEM High Glucose Medium		Gibco, Invitrogen, DE
(Dulbecco's Modified Eagle Medium)		

2.1.8 Plasmide

Tabelle 8: Plasmide

Vektorplasmid	Insertion/Merkmal	Herkunft/Referenz
pBlueScript II KS +/- (pBS)	pBR322 Plasmidderivat mit multipler Klonierungstelle	Stratagene, Heidelberg, DE
P5bPuroCMV-wt*EGFP* (wt*EGFP*)	Rekonstruktion des EGFP-Gens als Positivkontrolle für die Analyse homologer Rekombination	Akyüz et al. 2002 [3]
pcDNA3.1	Leervektor zur Kontrolle der Proteinexpression	Invitrogen Karlsruhe, DE
pCMV-hWtp53	p53-Wildtyp-Expressionsplasmid unter CMV-Promotorkontrolle	Roemer 1999 [84]
p53β	P53 Isoform mit alternativer C-Domäne (DQTSFQKENC)	J.C. Bourdon, Universität Dundee, Schottland [59]
p53γ	p53 Isoform mit alternativer C-Domäne (MLLDLRWCYFLINSS)	J.C. Bourdon, Universität Dundee, Schottland [59]
p53Δ40	p53 Isoform ohne die ersten 39 Aminosäuren [37]	J.C. Bourdon, Universität Dundee, Schottland [59]
p53Δ133	p53 Isoform ohne N-Terminus	J.C. Bourdon, Universität Dundee, Schottland [59]
p53Δ133β	p53 Isoform ohne N-Terminus sowie mit alternativem C-Terminus	J.C. Bourdon, Universität Dundee, Schottland [59]
p53Δ133γ	p53 Isoform ohne N-Terminus sowie mit alternativem C-Terminus	J.C. Bourdon, Universität Dundee, Schottland [59]

2.1.9 Bakterienstämme und Zellreihen

Tabelle 9: Zellreihen/Bakterienstämme

Zellreihe/Bakterienstamm	Merkmal	Herkunft/Referenz
K562	Humane myeloische Leukämie-Zellreihe, $p53^{-/-}$-Genotyp	ATCC® CCL-243 [3]
K562 (HR-*EGFP*/3*'EGFP*)	Humane myeloische Leukämie-Zellreihe mit stabil integriertem Vektor p5trsSV40HygbPuroCMV-HR, auch MHHR4 genannt	[3]
E.coli DH5α	F'/endA1 hsdR17 (rk-mk+) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nalr) relA1 (lacIZYA-argF)U169 deoR(80dlac(lacZ)M15)	New England Biolabs, Frankfurt am Main, DE [43]

2.1.10 Primäre Antikörper

Tabelle 10: Primäre Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Herkunft
Anti-Aktin	monoklonaler Maus-Antikörper, detektiert α-, β- und γ-Aktin-Isoformen	Calbiochem, Darmstadt, DE
Anti-a-Tubulin	monoklonaler Maus-Antikörper, detektiert das humane a-Tubulin an AS 426-450	Abcam, Cambridge, USA
Anti-p21	monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes p21, detektiert AS 134-142	Cemicon, Billerica, USA
Anti-p53 (DO-1)	monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes p53, detektiert AS 21-25	Calbiochem, Darmstadt, DE

Tabelle 10: Primäre Antikörper

Anti-p53 (PAB 1801)	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes p53, detektiert AS 32-79	Abcam, Cambridge, USA
Anti-p53 (PAB 240)	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes p53, detektiert an den AS 14-389	Calbiochem, Darmstadt
Anti-p53 (PAB 421)	Monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen humanes p53, detektiert an den AS 371-380	Calbiochem, Darmstadt, DE
Anti-p53-pSerin15	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen humanes p53, detektiert phosphoryliertes Serin 15	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
Anti-p53-pSerin15	Monoklonaler Maus-Antikörper 16G8	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
Anti-p53-pSerin315	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen humanes p53, detektiert phosphoryliertes Serin 315	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
Anti-GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase)	Monoklonaler Maus-Antikörper, Ladekontrolle	Abcam, Cambridge, UK
Anti-PCNA (Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen)	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen PCNA, PC 10	Abcam, Cambridge, UK
Anti-POLι (Polymerase iota)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper ab1324	Abcam, Cambridge, UK

Tabelle 10: Primäre Antikörper

Anti-BrdU (Bromdesoxyuridin) zur IdU-Detection (5-Iodo-2'-Deoxyuridine)	Monoklonaler Maus-Antikörper, Klon B44	BD BioScience
Anti-BrdU zur CldU-Detection (5-Chloro-2'-Deoxyuridine)	Monoklonaler Ratten-Antikörper, Klon BU1/75 [ICR1]	BioRad

2.1.11 Sekundäre Antikörper

Tabelle 11: Sekundäre Antikörper

Antikörper	**Herkunft**
Alexa Fluor 488 anti-rat	Invitrogen, Darmstadt, DE
Alexa Fluor 555 anti-mouse	Invitrogen, Darmstadt, DE
Goat anti-mouse, horseradish peroxidase (HRP)-labelled	Rockland, San Diego, USA
Goat anti-rabbit, horseradish peroxidase (HRP)-labelled	Rockland, San Diego, USA

2.2 Methoden

Vektoramplifikation

Für die Vektoramplifikation wurden kompetente E.coli-DH5α Bakterien auf Eis aufgetaut. 50 µl der Bakterien wurden mit 1,5–2 µl Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Das Suspensorium wurde anschließend für 90 sek auf 42 °C erhitzt, erneut für 5 min auf Eis inkubiert und zuletzt mit 1 ml LB-Medium angereichert. Nach einer Stunde bei 37 °C und Rotation im Inkubator wurden das Bakterien-Plasmid-Gemisch auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und für 12-24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Ansetzen einer Bakteriensuspension

Für die Tagkultur wurde entweder eine gewachsene Bakterienkolonie von einer Agarplatte oder aus einem eingefrorenen Bakterien-Stock (-80 °C) mittels steriler Pipettenspitze entnommen und in ein mit entsprechendem Antibiotikum versetztes Röhrchen überführt. Diese wurden für 5-7 Stunden bei 37 °C und Rotation inkubiert. Anschließend wurden jeweils 2 Bakterienröhrchen (10 ml) in mit 600 ml 1x LB-Medium und entsprechendem Antibiotikum (z.B. Ampicillin 1:1000) gefüllte Erlenmeyerkolben überführt und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert.

Ansetzen eines Bakterienstocks

Zum Einfrieren wurden 900 µl Bakteriensuspension mit 100 µl DMSO in ein Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C eingefroren.

Isolation der Plasmid-DNA

Die über Nacht hergestellte Bakteriensuspension wurde zunächst herunterzentrifugiert (5 min, 8500 rpm) und der Überstand wurde verworfen. Aus dem entstandenen Pellet wurde mittels PowerPrep™ HP Plasmid Maxiprep Kits (Marligen Biosciences Inc., Ijamsville, USA) nach dem Protokoll des Herstellers die Plasmid-DNA isoliert und über Nacht getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 300 - 700 µl TE-Puffer gelöst und mit Hilfe des NanoDrop Thermo Scientific (Thermo Scientific, Erlangen, DE) auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt. Als Referenz diente hier der TE-Puffer. Die eingestellte DNA wurde bei -20 °C eingefroren.

Restriktionsverdau

Zum Nachweis der entsprechenden Plasmid-DNA wurde mit jedem Aliquot ein Restriktionsverdau durchgeführt. Hierfür wurden die Aliquots mit einem Mix aus Restriktionsenzymen, Puffer, BSA und H_2O (insgesamt 20 µl) für mindestens drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle diente ein unverdauter Ansatz ohne Restriktionsenzyme.

Für die Gelelektrophorese wurden 1% Agarosegele vorbereitet. Zur Größenbestimmung wurde ein Gene Ruler DNA Ladder Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, DE) aufgetragen, sowie die Plasmidansätze nach Zusatz von Loading Dye. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 Volt mit einer Laufzeit von ca. 1 Stunde. Anschließend wurden die DNA-Banden mittels ImageLab detektiert.

Zellen auftauen

Zu Anfang wurden 15 ml Falcons mit jeweils 7,5 ml RPMI-1640-Medium mit 15% fetalem Kälberserum (FKS) und 1,2% Penicillin-Streptomycin-Glutamin befüllt. Als nächstes wurden die gefrorenen Zellröhrchen zum Auftauen im Wasserbad geschwenkt, anschließend vollständig in die vorbereiteten Falcons überführt und runterzentrifugiert (5 min, 1200 rpm). Der Überstand wurde verworfen, die Pellets mit jeweils 10 ml frischem Medium resuspendiert und in Suspensionsflaschen überführt. Die Suspensionsflaschen wurden im Inkubator bei 37 °C und 5% CO_2 gelagert.

Kultivierung von Suspensionszellen

Zur Kultivierung von Suspensionszellen [K562, K562(HR-*EGFP*/3‘-*EGFP*)] wurden die Zellen in RPMI-1640-Medium mit 15% FKS und 1,2% Penicillin-Streptomycin-Glutamin bei 37 °C und 5% CO_2 in Suspensionsflaschen inkubiert. Für die Anzucht wurde die Zellsuspension je nach Wachstumsdichte und benötigter Zellmenge 1:3 - 1:10 mit frischem Medium versetzt und erneut bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert.

Plasmid-Elektroporation mit K562(HR-*EGFP*/3‘-*EGFP*) Zellen

Die Plasmid-Elektroporation dient der Einschleusung der Plasmid-DNA in die verwendete Zellreihe. Hierbei werden die Zellen kurzzeitig einem elektrischen Feld ausgesetzt, wodurch die Zellmembran temporär permeabel wird und die Plasmide in die Zellen eindringen können. Hierfür wurde mittels Neubauer-Zählkammer die benötigte Menge Zellsuspension

berechnet, welche anschließend 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in kaltem DMEM-Medium ohne Phenolrot resuspendiert wurde, sodass man eine Zellkonzentration von $1x10^7$ Zellen pro ml erhielt.

Im nächsten Schritt wurden Plasmidmixe hergestellt, wobei 10 µl der Plasmide pcDNA, p53wt, p53β oder p53γ mit einer äquivalenten Menge des Vektors pBlueScript II KS +/- (pBS) und in einem zweiten Ansatz mit dem Vektor P5bPuroCMV-wt*EGFP* (wt*EGFP*) vermischt wurden. Die Plasmide haben alle eine Konzentration von 1 µg/µl. Für die Elektroporation wurden nun Elektroporationsküvetten (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) mit 400 µl Zellsuspension sowie 20 µl pBS- oder wt*EGFP*-Plasmidmix angesetzt und gründlich vermischt. Die Elektroporation wurde mit 200 V und 1050 F durchgeführt.

Im letzten Schritt wurden die transfizierten Zellen auf 6-Well-Platten übertragen. Jedes Well wurde mit 3 ml RPMI-1640-Medium mit 15% FKS und 200 µl transfizierte Zellen befüllt. Die 6-Well-Platten wurden sofort bei 37 °C inkubiert. Die Inkubationszeit von 24 h - 72 h variierte je nach Versuchsaufbau.

Rekombinationsmessung mittels Durchflusszytometrie

Für die Detektion der Transfektionseffizienz sowie der Rekombinationsfrequenz der Zelllinie wurde das von der Firma Becton Dickinson bereitgestellte Verfahren der Durchflusszytometrie (FACS) verwendet (Becton Dickinson, Heidelberg, DE). Hierbei wird die Zellsuspension durch eine Kapillare befördert und die Zellen gelangen einzeln in eine Durchflusszelle, wo sie durch Laserlicht (Argon Laser: 488nm) angeregt werden. Durch die Messung des reflektierten Lichts sowie des emittierten Fluoreszenzlichts können die Zellen näher charakterisiert werden. Bei der Lichtstreuung beeinflusst das Volumen der Zelle das Vorwärtsstreulicht. Das Seitwärtsstreulicht ist abhängig von der Granularität der Zelloberfläche, sowie der Beschaffenheit des Zellkerns und der enthaltenen Vesikel. Durch Messung des Fluoreszenzlichts, welches durch unterschiedliche Strukturen wie zum Beispiel durch die DNA der Zelle selbst emittiert wird, erhält man weitere Informationen über die Zelle. Hierbei ist unter anderem die Intensität der Emission entscheidend.

Rekombinationsanalyse

Die HR der DNA ist ein bekannter Mechanismus, bei dem durch einen Austausch von Schwesterchromatiden die genetische Diversität physiologisch erhöht wird. Sie spielt aber

auch bei der Reparatur von DSB eine Rolle. Für die Rekombinationsanalyse wurden Zellen der Linie K562 mit stabil integriertem *EGFP*-basiertem Rekombinationssubstrat verwendet [K562(HR-*EGFP*/3'*EGFP*)]. Durch die HR der Zell-DNA kommt es zur Rekonstruktion des *EGFP*-Gens. Somit befähigt sie die Zellen zur Produktion eines grün fluoreszierenden Proteins, welches durch die Durchflusszytometrie messbar ist.

Das verwendete Konstrukt der Zelllinie setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen. Der erste Abschnitt besteht aus dem *EGFP*-Rekombinationsakzeptorgen, bei welchem im Vergleich zum wt*EGFP* 4 Basenpaare durch eine I-*Sce* I-Erkennungssequenz ersetzt wurden. Hierdurch lässt sich in diesem Bereich unter Kontrolle eines CMV-Promotors ein DSB generieren. Da für meinen Versuchsaufbau die replikations-assoziierte Rekombination von Interesse war, fand die Induktion von I-*Sce* I induzierten DSB hier keine Verwendung. Diese auch als SR bezeichneten Events werden höchstwahrscheinlich durch endogene Replikationsblockaden hervorgerufen, da die Rekombination ein sehr häufig verwendeter Mechanismus ist, um Replikationsblockaden zu überwinden.

Auf den sich anschließenden DNA-Abschnitt mit Abstandshalterfunktion folgt das *EGFP*-Rekombinationsdonorgen. Der Unterschied zum wt*EGFP* findet sich in dem Ersatz des Startcodons (ATG) durch zwei Stopcodons (TAG und TGA). Kommt es im Verlauf der Zeit zu endogenen Replikationsblockaden im Bereich des *EGFP*-Akzeptorgens, ist es der Zelle durch replikations-assoziierte Rekombination möglich, aus *EGFP*-Akzeptor und *EGFP*-Donor ein wt*EGFP*-Gen herzustellen und grün fluoreszierende Proteine zu generieren.

Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurde die transfizierte K562(HR-*EGFP*/3'*EGFP)*-Zellsuspension vollständig in frische Falcons überführt und anschließend 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in ca. 300 µl PBS, 0,2% EDTA resuspendiert, in FACS-Röhrchen transferiert und bis zur Messung in einem Ständer auf Eis gelagert. Die Durchflusszytometrie erfolgte mit einer diagonalen Kategorisierung mit FL1/FL2 dot plot (FACS Calibur® FACScan, BD Biosciences, Heidelberg, Argon Laser mit 488 nm), wobei zwischen lebenden *EGFP*-positiven und negativen Zellen unterschieden wurde. FL1 (515-545 nm) erkennt grün fluoreszierendes Licht, FL2 (564-606 nm) erkennt die orange Autofluoreszenz der Zellen. Zur Messung von spontan vorkommenden Rekombinationen wurden soweit möglich 1.000.000 lebende Zellen (SSC/FSC Gate)

analysiert. Anschließend wurden die Rekombinationsfrequenzen individuell auf die Transfektionseffizienzen korrigiert.

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde parallel zur Rekombinationsmessung eine Transfektionsmessung durchgeführt. Hierfür wurden Zellen aus demselben Zellpool verwendet. Zusätzlich zur Transfektion des p53-Plasmids oder einer seiner Isoformen wurde anstatt eines pBS-Leervektors ein wt*EGFP*-Vektor transfiziert. Die Transfektionsmessung wurde mit 100.000 lebenden Zellen durchgeführt.

Proteinbestimmung mittels Western Blot

Zelllyse zur Proteingewinnung

48 h nach der Elektroporation wurden die Zellsuspensionen aus ihren 6-Well-Platten in 15 ml Falcons überführt, bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert und anschließend wurde der Überstand verworfen. Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml kaltem PBS resuspendiert und erneut bei 13.000 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls verworfen und das Pellet dieses Mal mit 30-50 µl frisch angesetztem Lysispuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Das Zelllysat wurde im nächsten Schritt bei 4 °C und 13.000 rpm für 15 min zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand mit dem extrahierten Protein in gekühlte Eppendorftubes überführt und weiterhin auf Eis gelagert.

Konzentrationsbestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) verwendet. Das Prinzip der BCA-Methode (Bicinchoninsäure-Methode) beruht auf der Reduktion von zweiwertigen zu einwertigen Kupferionen durch das zugefügte Protein und anschließender Bildung eines blauvioletten Chelatkomplexes [48]. Die Komplexmenge ist dabei proportional zur Proteinmenge und photometrisch bei 570 nm messbar.

Für die Messung wurde eine BSA-Standardkurve mit den Konzentrationen 2000 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 0 µg/ml (pro Konzentration 3 Wells a 10 µl) und einer Leerprobe auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Das Lysat wurde mit Lysispuffer 1:10 verdünnt und parallel zur Standardkurve mit 2 Wells à 10 µl auf die Platte pipettiert. Sowohl die Standardkurve als auch das Protein wurden schließlich mit

200 µl BCA-Mix versetzt. Die 96-Well-Platte wurde anschließend 30 min bei 37 °C inkubiert. Die optische Dichte konnte nun mittels des Mikrotiterplatten-Photometers Sunrise™ (Tecan Trading AG, Schweiz) bestimmt werden. Zuletzt wurden die Proteine mit β-Mercaptoethanol und 6x SDS auf 5-6 mg/ml eingestellt, 10 min bei 95-99 °C denaturiert und bei -80 °C eingefroren.

Gelelektrophorese

Um Proteine durch einen Western Blot nachzuweisen wurde als Methode die diskontinuierliche SDS-Page verwendet. Hierfür mussten die Proteine zunächst auf ein biphasisches SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und nach ihrer Größe in einer RunOne™ Electrophoresis Unit (Embitec, San Diego, USA) elektrophoretisch aufgetrennt werden. Im nächsten Schritt wurden die Proteine in einem TE22 Mighty Small Transfer Tank (Hoefer Inc., Richmond CA, USA) von ihrem Gel auf eine Hybond-C-Extra Nitrocellulose Membran (Amersham Biosciences, Freiburg) übertragen, wo sie durch mehrfache Inkubation mit primären und sekundäre Antikörpern detektiert werden konnten.

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgele bestehen aus einem Sammelgel zum Auftragen und Sammeln der Proteine und einem Trenngel für ihre elektrophoretische Auftrennung. Die Gelmischungen wurden nach dem weiter unten aufgeführten Pipettierschema getrennt voneinander in 50 ml Falcons vorbereitet, wobei 10% APS und TEMED für die Polymerisation erst kurz vor dem Befüllen der Gelgießkammer dem Gemisch beigefügt wurden. Zunächst wurden ca. 30 ml Trenngelmischung mit ungefähr 2 cm Abstand zur Oberkannte in die Gelgießkammer (Hoefer, San Francisco, USA) überführt. Die Kammer wurde daraufhin mit Isopropanol aufgefüllt, um eine gerade Kante des Trenngels zu erhalten und die Polymerisation nicht durch Sauerstoff zu behindern. Nach 30-45 min war die Polymerisation des Trenngels abgeschlossen und das Isopropanol konnte abgegossen werden. Im zweiten Schritt wurde die Kammer mit Sammelgel aufgefüllt und es wurden sofort Kämme zur Taschenbildung eingeführt. Nach Beendigung der Trenngelpolymerisation wurden die Gele bis zur Verwendung innerhalb von 14 Tagen feucht verpackt und bei 4 °C gelagert.

Pipettierschema der SDS-Polyacrylamidgele

Tabelle 12 SDS - Polyacrylamidgele

	Trenngel		Sammelgel
Proteingröße	16-70 kDa 12% Gel	12-45 kDa 15% Gel	-
30% Acrylamid 0,8 Bisacrylamide	18 ml	22,50 ml	3,9 ml
4x SDS/Tris pH 8,8 (Natriumdodecylsulfat)	11,25 ml	11,25 ml	-
4x SDS/Tris pH 6,8	-	-	7,5 ml
H_2O	15,75 ml	11,25 ml	18,3 ml
10% APS (Ammoniumpersulfat)	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	30 µl	30 µl	30 µl
Bromphenolblau	50 µl	50 µl	100 µl

Gelelektrophorese

Zu Beginn erfolgte die Proteinvorbereitung mittels Denaturierung bei 97 °C für 7-10 min. Des Weiteren wurden die Gele in RunOne™ Electrophoresis Units eingesetzt, welche mit 1x Rotiphorese SDS-Page-Puffer befüllt wurden. Anschließend konnten die Geltaschen mit einem PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™, Erlangen) als Größenmarker oder einer Proteinprobe befüllt werden. Die Gelelektrophorese erfolgte mit 25 mA pro Gel.

Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die Proteine auf eine Hybond-C-Extra Nitrocellulose Membran (Amersham Biosciences, Freiburg) geblottet. Dafür wurde das Gel sowie die Membran in die Blotting-Kammer Mighty Small Transfer Tank TE22 (Hoefer Inc., Richmond CA, USA) überführt. Der Transfer Tank wurde mit 1x HMW-Puffer befüllt und auf Eis gelagert. Das Blotten erfolgte für 40 min bei 100 V und wurde anschließend durch kurzes Tränken der Membran in Ponceau-S-Lösung überprüft. Die entstandenen Banden wurden mit TBS-Puffer wieder abgewaschen.

Detektion der Proteine mittels Antikörper

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungsstellen bei der Immundetektion wurde die geblottete Membran für eine Stunde in TBS-Puffer mit 5% Milchpulver auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran mit 1 ml des gewünschten Primärantikörpers in TBS-T-Puffer mit 5% Milchpulver in Folie eingeschweißt und über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert.

Nach drei fünfminütigen Waschschritten in TBS-T-Puffer, wurde die Membran mit dem entsprechenden Sekundärantikörper ebenfalls in 5% TBS-Milch für 45 min bei RT inkubiert. Zur Entfernung des überschüssigen Antikörpers wurde die Membran erneut in TBS-T gewaschen und anschließend für die Antikörperdetektion 5 min mit SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, USA) benetzt. Hierbei wurde die Chemilumineszenzreaktion, bei der Luminol durch eine an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase angeregt wird, aktiviert. Mittels des ChemiDoc MP Imaging Systems (BioRAD, Hercules, USA) konnten nun die entstehenden Banden mit einer Belichtungszeit von 1 - 60 sek festgehalten werden.

Um die Membran für weitere Proteindetektionen verwenden zu können, musste die Membran für 15 - 30 min mit Western Blot-Stripping-Puffer (Perbio Science, Bonn, DE) behandelt werden. Es folgte ein Waschprozess von 3 x 5 min in TBS-T und ein erneutes Blocken in 5% TBS-T-Milch. Anschließend konnte die Membran für weitere Antikörper-Inkubationen und Detektionen verwendet werden.

Western Blot-Titration

Im Laufe meiner Doktorarbeit stellte sich heraus, dass sich die Proteinexpression zwischen p53wt und den p53-Isoformen trotz gleicher Menge transfizierter DNA teilweise drastisch unterschieden. Daher wurde die transfizierte Plasmidmenge entsprechend der Expressionslevel angepasst.

Für die Einstellung der Plasmide auf die gleiche Proteinexpressionsmenge wurden zunächst Plasmidmixe unterschiedlicher Konzentration hergestellt und elektroporiert. Dabei wurde das jeweilige Plasmid gegebenenfalls mit einem Leervektor ergänzt, um vergleichbare Plasmidmengen zu elektroporieren. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Proben mittels BCA-Methode eingestellt und ein Western Blot durchgeführt. Anhand der

Western Blot-Banden mit unterschiedlichen Proteinexpressionen ließen sich die äquivalenten Plasmidmengen bestimmen. Nachfolgende Experimente konnten mit gleichen Mengen an exprimiertem Protein durchgeführt werden.

In situ Proximity Ligation Assay (PLA)

Der PLA dient zum Nachweis einer möglichen Protein-Protein-Assoziation. Befinden sich die zwei Proteine von Interesse in räumlicher Nähe zueinander, kommt es nach der Detektion mittels primärer Antikörper zur Verbindung von Oligonukleotiden, die an die sekundären Antikörper gebunden sind (PLA Probes). Nach stattgefundener Ligation und der daraus resultierenden Ringbildung der Oligonukleotide kommt es zur Vervielfältigung mittels Amplifikation. Das entstandene Produkt ist aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaft der Oligonukleotide als PLA-Foci mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskop detektierbar und ist der Nachweis für die Protein-Protein- Assoziation.

Für den Versuch wurden wie zuvor beschrieben unterschiedliche Plasmide in K562-Zellen transfiziert und in 6-Well-Platten für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Pro Plasmid wurden zwei Ansätze 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend für 45 min bei 37 °C in RPMI Medium inkubiert. Hierbei wurde für einen Ansatz das Medium durch Mitomycin C (MMC) ergänzt. MMC ist bekannt als DNA-Interstrand-Crosslinker und verursacht vermehrt Replikationsblockaden, welche mittels HR überwunden werden können. MMC findet unter anderem Verwendung in der Tumortherapie.

Nach beendeter Inkubationszeit wurde das Medium ± MMC entfernt und das Zellpellet in 2,5 ml frischem Medium resuspendiert. Es folgte eine Inkubation in 6-Well-Platten für 2 h (Ansatz ohne MMC) bzw. 3 h (Ansatz mit MMC). 1 ml pro Zellsuspension wurde in einem Eppendorftube erneut zentrifugiert für 1 min bei 5000 rpm und nach Entfernung des Überstandes in 200 µl PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation für 5 min und 500 rpm auf Objektträger übertragen. Zur Fixierung kamen die Slides 10 min in 3,7% Formaldehyd.

Im nächsten Schritt wurden die Zellen auf dem Objektträger 12 min in 0,5% PBS-Triton permeabilisiert und 3 x 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben jeweils für 1 h bei RT mit 5% Goat Serum geblockt, mit einem entsprechenden Antikörpergemisch bei 37 °C / 1h und anschließend mit den PLA Probes ebenfalls bei 37 °C / 1h inkubiert.

Hierfür wurde das Duolink® In Situ Orange Starter Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) verwendet. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Objektträger erneut in PBS gewaschen und für die Inkubation in lichtundurchlässigen befeuchteten Boxen gelagert.

Für die Ligation ließ man die PLA Probes ablaufen und die Objektträger wurden nach einem Waschvorgang von 2 x 5 min in Waschpuffer A mit 40 µl Ligationslösung beträufelt und 30 min bei 37 °C inkubiert.

Nun wurden die Proben erneut 2 x 2 min in Waschpuffer A gewaschen und mit 40 µl Amplifikationslösung für 100 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend fand ein erneuter Waschprozess für 2 x 10 min in 1x Waschpuffer B und für 1 min in 0,01x Waschpuffer B statt.

Zuletzt wurden die Zellen auf den Objektträgern mit 15 µl Duolink *in situ* Mounting Medium mit DAPI beträufelt und mit einem Coverslide bedeckt. Die Analyse der Proben wurde mithilfe des Keyence BZ-9000 Mikroskopes und der BZ-II Analyser Software durchgeführt.

DNA-Fiber-Spreading-Assay mit K562 Zellen

Der DNA-Fiber-Spreading-Assay ist ein Verfahren zur Darstellung von neu synthetisierter DNA, Replikationsphänotypen, Replikationsursprüngen sowie -terminationen. Während der DNA-Replikation kommt es zum Einbau von den unterschiedlich halogenierten Nukleotiden 5-Iodo-2'-Deoxyuridin (IdU) und 5-Chloro-2'-Deoxyuridin (CldU) in den entstehenden DNA-Strang. Unter Verwendung von fluoreszierenden Antikörpern lässt sich eine sowohl qualitative als auch quantitative *in vivo* Analyse der DNA-Replikation durchführen.

Die zuvor transfizierten Zellen wurden nach 48 h von ihren 6-Wellplatten geerntet. Für den Fiber-Spreading-Assay und die Differenzierung zwischen unbehandelten und mit MMC behandelten Proben wurden zwei Ansätze mit $5x10^5$ Zellen pro Plasmid ausgezählt. Die Zellsuspensionen wurden 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden mit 1 ml CldU-haltigem Medium (20 µM) für 20 min bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Der Überstand wurde anschließend erneut abzentrifugiert und es folgte die Inkubation mit 1 ml IdU-haltigem Medium (200 µM) für weitere 20 min bei 37 °C und 5% CO_2. Hierbei wurde ein Ansatz unbehandelt belassen und der andere

zusätzlich zum IdU noch mit 3 µM MMC versetzt. Nach einmaligem Waschen in kaltem PBS wurden die Zellen mit kaltem PBS auf 1250 Zellen/ml eingestellt und auf Eis gelagert.

Für die Zelllyse wurden 2 µl Zellen und 6 µl Lysispuffer (0,5% SDS, 200 mmol Tris–HCl (pH 7,4), 50 mmol EDTA) auf einem Objektträger vermengt und mit der Pipettenspitze durch immer größer werdende kreisförmige Bewegungen auf dem Objektträger verteilt. Nach 6 min wurden die Objektträger 20°-30° aufgerichtet, sodass sich die DNA aufgrund von der Gravitation verteilt. Nach weiteren 6 min Trocknungszeit wurden die Proben 5 min in Fixierlösung (3:1 Methanol/Eisessig) inkubiert, für weitere 7 min getrocknet und zuletzt in 70% Ethanol gelagert.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde die DNA zunächst 1 h in 2,5 N HCl denaturiert und darauffolgend in 5% BSA geblockt (45-60 min, 37 °C). Als primäre Antikörper wurde Anti-BrdU (Maus-Antikörper) zur Detektion von IdU und Anti-BrdU (Ratten-Antikörper) zur Detektion von CldU verwendet. Nach mehrmaligem Waschen mit 0,05% PBS-Tween und PBS folgte die Inkubation mit den sekundären Antikörpern AlexaFluor555 (Anti-Maus für IdU) und AlexaFluor488 (Anti-Ratte für CldU). Die DNA-Fiber wurde mit dem Keyence Mikroskop BZ-9000 bildlich festgehalten und mittels BZ-II Analyser ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Die Beeinflussung der replikations-assoziierten Rekombination durch p53 und seine Isoformen

Restle et al. 2008 [81] konnten im Labor meiner Dissertationsbetreuerin Prof. Dr. Lisa Wiesmüller erstmals zeigen, dass das Protein p53 neben einem inhibitorischen [3, 98] auch einen steigernden Effekt [18, 36, 81] auf die Frequenz der replikations-assoziierten Rekombination ausübt. Darüber hinaus können auch p53-Isoformen durch die Modulation von p53-Zielgenen die Rekombination beeinflussen, wie die p53Δ133-abhängige Neutralisierung der RAD51-Inhibition, die konsekutiv zu einer dereprimierten Expression des HR-Schlüsselproteins Rad51 führt [5, 12, 38]. Daher erscheint es als sinnvoll, neben p53 auch die Isoformen bei der Analyse dieses Mechanismus mit einzubeziehen.

In meiner Arbeit übernahm ich das von Akyüz et al. 2002 [3] entwickelte Verfahren, wobei zur Rekombinationsanalyse Zellen der Erythroleukämie-Linie K562 mit stabil integriertem Rekombinationssubstrat (HR-*EGFP*/3'*EGFP*) verwendet werden [Abbildung 5 (A)]. Die Zellen transfizierte ich mit jeweils einem Expressionsplasmid (p53wt, p53β, p53γ) oder einem entsprechenden Leervektor (pcDNA), sowie entweder mit pBS als Leervektor zur Rekombinationsanalyse oder mit dem Expressionsplasmid wt*EGFP* zur Transfektionskontrolle. Da die replikations-assoziierte Rekombination an den physiologischen DNA-Metabolismus gekoppelt ist und somit deutlich seltener vorkommt als die durch DSB getriggerte Rekombination, welche durch die Megaendonuklease I-*SCE* I induziert werden können, habe ich in diesem Versuchsaufbau mit einer sich an die Transfektion anschließenden Inkubationszeit von 72 h gearbeitet und mindestens eine Million lebende Zellen gemessen. Zur Bestimmung der replikations-assoziierten Rekombinationsfrequenz wurde der Anteil an grün fluoreszierenden Zellen nach der Rekonstruktion des wt*EGFP*-Gens mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Hierbei bestätigte sich, wie in Abbildung 5 (B) zu sehen ist, zunächst die stimulierende Funktion des p53wt's in Bezug auf die replikations-assoziierte Rekombination. Die Rekombinationsfrequenz entspricht bei der Kontrolle nur 39% ($p < 0{,}0001$) im Vergleich zum Wildtyp mit 100%. Die relative Rekombinationsfrequenz der Isoform p53β ist mit 34% ($p < 0{,}0001$) signifikant niedriger im Vergleich zu p53wt, ebenso wie bei der Isoform p53γ, bei der die Rekombinationsfrequenz nur 24% ($p < 0{,}0001$) beträgt.

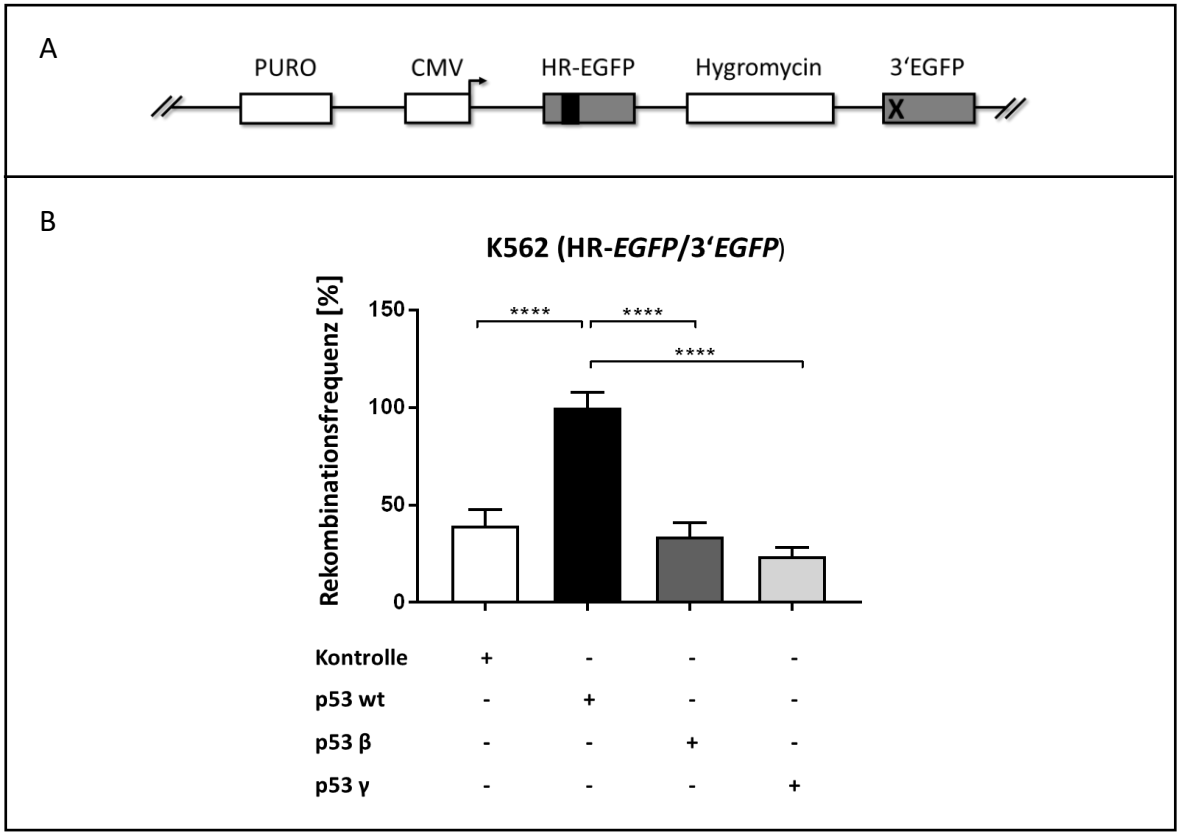

Abbildung 5 **Relative replikations-assoziierte Rekombination nach der Transfektion von K562-Zellen (HR-*EGFP*/3'*EGFP*) mit den Expressionsplasmiden p53wt, p53β oder p53γ**

(**A**) Schematische Darstellung des EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)-Rekombinationssubstrates integriert in K562(HR-*EGFP*/3'*EGFP*)-Zellen. Pyromycin-Resistenzgen (PURO), CMV-Promotor (CMV), EGFP-Akzeptorgen (HR-*EGFP*) mit inaktivierender Frameshift-Insertion (schwarzes Quadrat), Hygromycin-Resistenzgen mit Spacerfunktion (Hygromycin), EGFP-Donorgen (3'EGFP) mit Austausch des Start-Codons durch zwei Stop-Codons zur Inaktivierung (Kreuz).

(**B**) Zellen der Linie K562(HR-*EGFP*/3'*EGFP*) mit stabil integriertem Rekombinationsprodukt wurden mit jeweils 10 µl (10 µg) eines Expressionsplasmids p53wt (Wildtyp), p53β, p53γ oder pcDNA als Kontrolle transfiziert. Zusätzlich wurden die Plasmidmixe mit pBS (pBlueScript II KS +/-) als Leervektor oder wt*EGFP* (Enhanced Green Fluorescent Protein Wildtyp) zur Bestimmung der Transfektionseffizienz ergänzt. Nach einer anschließenden Inkubation von 72 h bei 37 °C und 5% CO_2 erfolgte mittels Durchflusszytometrie die Messung grün fluoreszierender Zellen zur Bestimmung der Rekombinationsfrequenz, wobei 1.000.000 lebende Zellen zur Rekombinationsanalyse und 100.000 lebende Zellen zur Transfektionskontrolle ausgewertet wurden. Es erfolgten drei biologisch unabhängige Messungen mit je 6 Replikaten. Die Ergebnisse wurden entsprechend der Transfektionseffizienz korrigiert. Der Mittelwert für die Rekombinationsfrequenz von p53wt wurde auf 100% festgelegt (absolut $4{,}5 * 10^{-5}$) und die weiteren Ergebnisse wurden entsprechend ins Verhältnis gesetzt.

Für die graphische Darstellung und die Berechnung der statistisch signifikanten Unterschiede mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests mit nachfolgendem Mann-Whitney-U-Test (**** $p < 0{,}0001$), Fehlerbalken +/- SEM (standard error of the mean) wurde GraphPad Prism 7 verwendet.

Beide Isoformen zeigen somit eine deutliche Reduktion der bei p53wt beobachteten Stimulation der replikations-assoziierten Rekombination. Beim Vergleich der Isoformen mit der Kontrollreihe zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass die Manipulation des C-Terminus zu einem Verlust der stimulierenden Eigenschaft von p53 bei der replikations-assoziierten Rekombination führt.

3.2 Die Assoziation von PCNA mit p53 und seinen Isoformen

Der in Hampp et al. 2016 [42] neu beschriebene Bypass von Replikationsblockaden beinhaltet die enge Zusammenarbeit von den Replikations-Cofaktoren PCNA sowie von POLι mit p53. In ihrer Masterarbeit [61] konnte Tina Kießling diese Protein-Protein-Interaktion von p53 und PCNA bereits mittels Immunpräzipitation (IP) nachweisen, welche Stephanie Biber in ihrer Doktorarbeit [41] mittels *in situ* PLA verifizierte. Hierbei wurde getestet, ob p53pSer15, eine phosphorylierte Form von p53, sich in räumlicher Nähe (<40 nm) zu PCNA befindet. Sengupta et al. 2003 [87] beschrieben bereits, dass p53pSer15 an Stellen von angehaltenen Replikationsgabeln akkumuliert. Restle et al. 2005 [82] zeigten darüber hinaus mittels IP, dass p53pSer15 auch mit HR-Schlüsselproteinen wie RAD51, RAD54, MRE11 und BLM interagiert.

In meiner Versuchsreihe habe ich erneut K562 Zellen mit p53wt, p53β und p53γ transfiziert und mittels PLA auf eine Assoziation von p53pSer15 mit PCNA untersucht [Abbildung 6 (A)]. Wie bereits in der Doktorarbeit von Stephanie Biber gezeigt [41], lässt sich im Vergleich zur Negativkontrolle ohne Expression von p53 die Assoziation von p53wt und PCNA durch eine Akkumulation von PLA(p53pSer15/PCNA)-Foci darstellen ($p < 0{,}0001$). Die p53-Isoform p53β zeigt ebenfalls eine gesteigerte Akkumulation von PLA-Foci im Vergleich zur Negativkontrolle ($p < 0{,}0001$). Im Vergleich zu p53wt zeigte sie jedoch eine um 18% reduzierte Akkumulation, diese weist allerdings keinen signifikanten Unterschied auf. Die Isoform p53γ zeigt kaum eine Akkumulation von PLA-Foci und somit eine statistisch signifikante Reduktion der PLA-Foci im Vergleich zu p53wt um 82% ($p < 0{,}0001$) sowie zu p53β um 64% ($p < 0{,}0001$). Darüber hinaus untersuchte ich, wie sich die Protein-Protein-Interaktion durch gentoxischen Stress ausgelöst durch MMC verändert [Abbildung 6 (B)]. Hier konnte ich die Akkumulation von PLA(p53pSer15/PCNA)-Foci bei p53wt-exprimierenden Zellen verifizieren. Interessanterweise zeigten hier beide p53-Isoformen p53β und p53γ eine statistisch signifikante Erhöhung der PLA-Foci um 33% ($p < 0{,}0119$) bzw. 22% ($p < 0{,}0278$) im Vergleich zur Negativkontrolle. Ähnlich wie in den unbehandelten Zellen zeigten p53β mit 62% ($p < 0{,}0192$) und p53γ mit 51% ($p < 0{,}0068$) jedoch insgesamt ein geringeres Interaktionsverhalten im Vergleich zu p53wt.

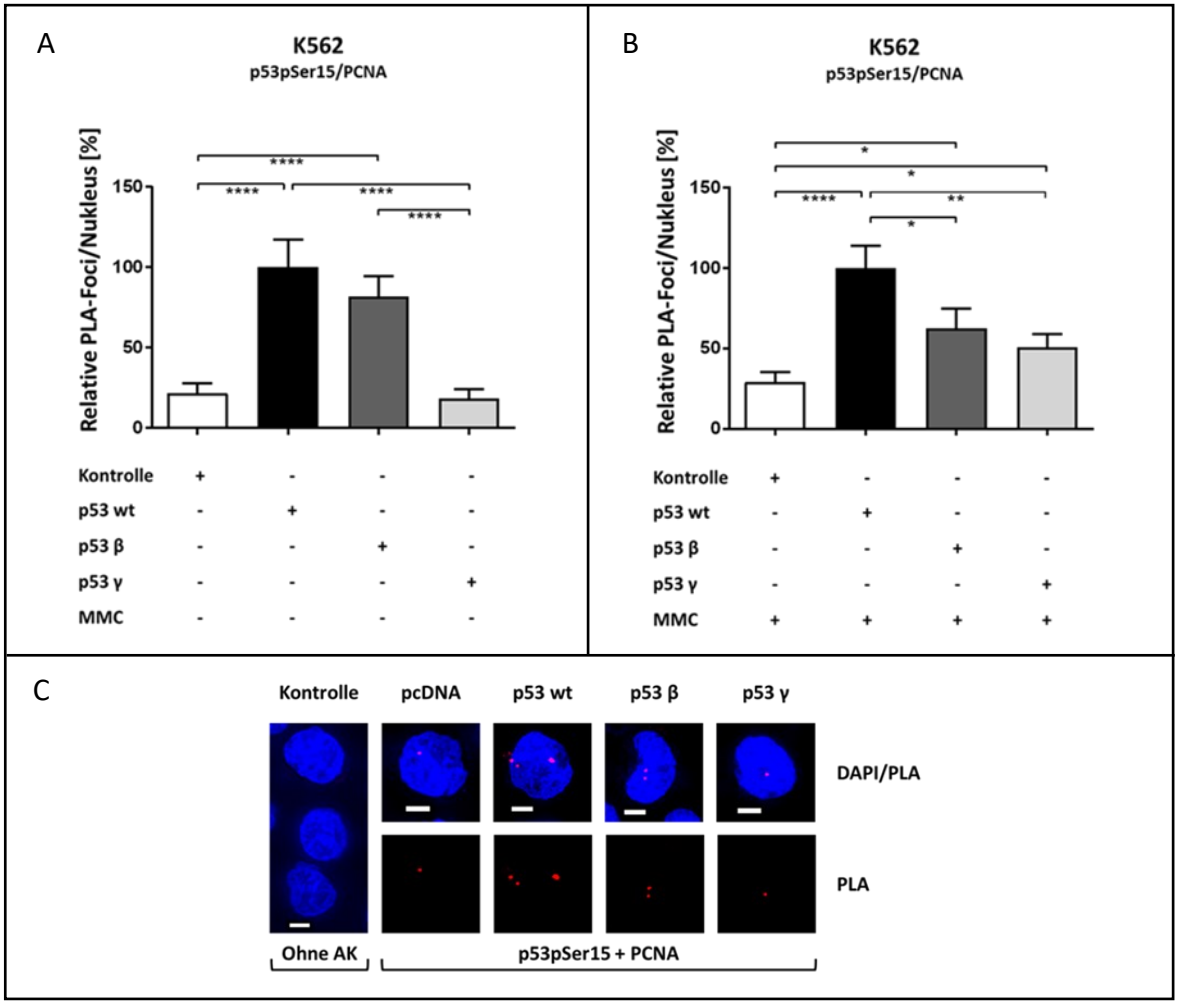

Abbildung 6 **PLA-Analyse der Protein-Protein-Assoziation von p53pSer15 und PCNA**

Für den PLA (Proximity Ligation Assay) wurden 10 µl (10 µg) der Expressionsplasmide p53wt (Wildtyp), p53β, p53γ oder pcDNA als Leervektor in K562-Zellen transfiziert und für 48 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung in zwei Ansätzen für 45 min mit unbehandeltem oder MMC (Mitomycin C) behandeltem Medium (3 µM) und eine erneute Inkubation in frischem Medium für 3 h. Die Zellen wurden auf Objektträger mittels Zentrifugation überführt, fixiert, permabilisiert und nach der Blockierung von unspezifischen Bindungen durch Goat Serum mit einem primären Antikörpermix bestehend aus Anti-p53pSer15 (Kaninchen) und Anti-PCNA (Anti-Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen) (Maus) für die Proteindetektion behandelt (37 °C, 1 h). Nach einem Waschschritt wurden die PLA-Probes (Anti-Kaninchen PLUS, Anti-Maus MINUS) aufgetragen (37 °C, 1 h). Es folgte die Behandlung mit der Ligationslösung (30 min, 37 °C) zur Ringbildung der Oligonukleotide sowie mit der Amplifikationslösung (100 min, 37 °C) zur DNA-Vermehrung. Zwischengeschaltet fanden Waschschritte entsprechend dem PLA-Protokoll statt. Zuletzt wurde der Nukleus mittels Duolink in situ Mounting Medium mit DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol) gefärbt. Die Kontrolle wurde ohne primären Antikörper (AK) durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop (Keyence BZ-9000). Insgesamt wurden pro Expressionsplasmid 135 Nuklei aus zwei biologisch unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei Objektträgern pro Plasmid ausgewertet.

Graph (**A**) zeigt die relative Anzahl der PLA-Foci/Nukleus nach der Transfektion der Expressionsplasmide ohne nachfolgende Behandlung. Der Mittelwert von p53wt ohne MMC wurde auf 100% festgesetzt und entspricht absolut 0,44 Foci/Nukleus. Graph (**B**) zeigt die relative Anzahl der PLA-Foci/Nukleus nach MMC-Behandlung. Der Mittelwert von p53wt + MMC entspricht absolut 0,69 Foci/Nukleus und wurde ebenfalls auf 100% festgesetzt. Die Anfertigung der Graphen erfolgte mit GraphPad Prism. Die statistische Berechnung wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (**** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$), Fehlerbalken +/- SEM (standard error of the mean). Abbildung (**C**) zeigt repräsentativ die gefärbten Nuklei inklusive PLA-Foci. Die Skala entspricht 5 µm. Die Kontrolle wurde ohne primären Antikörper durchgeführt. Die obere Reihe entspricht der gemeinsamen Aufnahme von DAPI-gefärbten Nukleus und PLA-Foci. Die untere Reihe zeigt nur die PLA-Foci.

Im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen ist nach MMC-Behandlung der Unterschied von p53wt zu p53β signifikant. Setzt man die unbehandelten PLA-Foci ins Verhältnis mit den PLA-Foci nach MMC-Behandlung (nicht dargestellt), so fällt auf, dass es durch den DNA-Crosslinker zu einem Anstieg der PLA-Foci bei p53wt um 55% ($p < 0,0309$) und bei p53γ um 59% ($p < 0,0001$) kommt. Bei p53β zeigt sich kein signifikanter Anstieg nach MMC-Behandlung.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass p53β ein ähnliches Interaktionsverhalten zu PCNA wie p53wt präsentiert, p53γ hat im Gegensatz dazu die Assoziation zu PCNA verloren. Durch zusätzlichen gentoxischen Stress ausgelöst durch MMC nimmt die PLA Foci-Anzahl bei p53wt und p53γ zu, nicht jedoch bei p53β. Insgesamt weisen hier jedoch beide Isoformen ein deutlich schwächeres Interaktionsverhalten mit PCNA auf als der Wildtyp.

3.3 Die Assoziation von POLι mit p53 und seinen Isoformen

Als nächsten Schritt untersuchte ich die Interaktion von p53 mit POLι näher. Stephanie Biber und Tina Kießling konnten eine Interaktion vom p53wt mit POLι mittels IP von GFP-getaggtem p53 und POLι sowie mittels PLA nachweisen. Um genaueres über die Assoziation der p53-Isoformen im Vergleich zu p53-negativen Zellen bzw. p53wt zu erfahren, führte ich einen PLA mit p53wt, p53β und p53γ durch und untersuchte die Zellen auf eine Assoziation von Polι mit p53pSer15.

Wie in Abbildung 7 (A) zu sehen ist, konnte ich die Ergebnisse aus dem Labor meiner Dissertationsbetreuerin Prof. Dr. Lisa Wiesmüller reproduzieren und die Assoziation von POLι und p53wt durch einen Anstieg der PLA(p53pSer15/POLι)-Foci nach der Behandlung mit MMC (3 µM) im Vergleich zur Negativkontrolle aufzeigen ($p < 0,0001$). Darüber hinaus betrug die relative Foci-Anzahl bei p53β nur 27% und bei der p53γ-Isoform lag sie nur bei 8%, was eine Reduktion von 73% ($p < 0,0001$) sowie 92% ($p < 0,0001$) im Vergleich zu p53wt entspricht.

Ähnlich wie bei der Assoziation von p53pSer15 und PCNA ohne Behandlung zeigt die p53γ-Isoform auch bei der Assoziation von p53pSer15 und POLι eine statistisch signifikante Reduktion der PLA(p53pSer15/POLι)-Foci um 19% im Vergleich zu p53β ($p < 0,0001$). Im Gegensatz zu p53γ zeigt p53β eine Steigerung der Akkumulation von PLA(p53pSer15/POLι)-Foci um 19% im Vergleich zur p53-Negativkontrolle ($p < 0,0002$). Ergänzend zum vorherigen

Versuch zeigt sich somit auch eine Reduktion bzw. ein Verlust der Assoziation von den p53-Isoformen mit der POLι. In Abbildung 8 ist der zugehörige Western Blot zum Nachweis des Proteins p53pSer15 abgebildet.

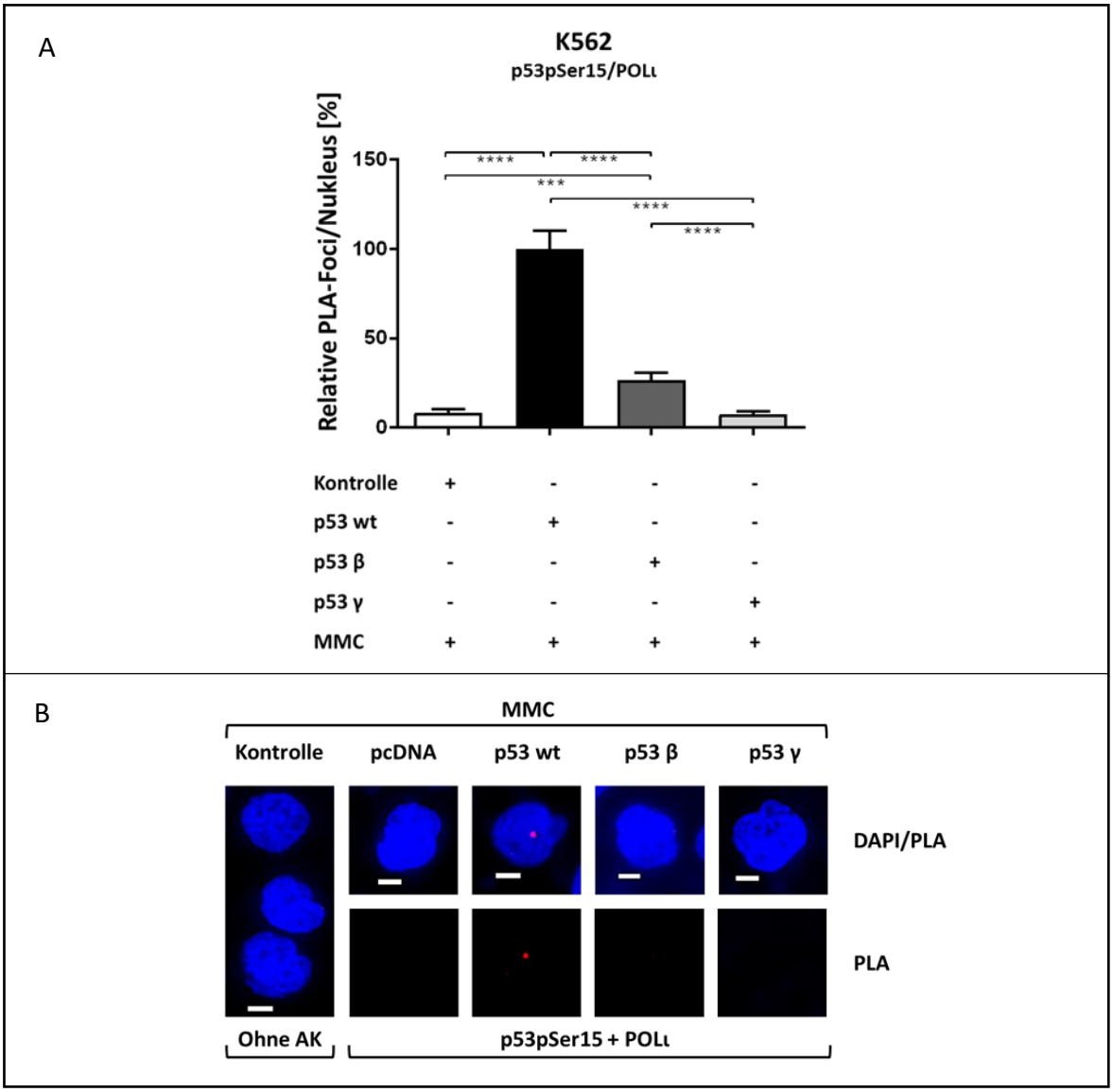

Abbildung 7 **PLA-Analyse der Protein-Protein-Assoziation von p53pSer15 und Polι nach MMC-Behandlung**

Es wurden erneut K562-Zellen mit 10 µg der Expressionsplasmide p53wt (Wildtyp), p53β, p53γ oder pcDNA als Leervektor transfiziert. Anschließend wurde der PLA (Proximity Ligation Assay) wie in Abbildung 5 beschrieben durchgeführt. Als primäre Antikörper wurden Anti-p53pSer15 (Maus) und Anti-POLι (Polymerase iota) (Kaninchen) verwendet. Die Analyse erfolgte mit dem Floureszenzmikroskop (Keyence BZ-9000). Insgesamt wurden pro Expressionsplasmid 190 Nuklei aus zwei biologisch unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei Objektträgern pro Plasmid ausgewertet.

Der Graph (**A**) zeigt die relative Anzahl der PLA-Foci/Nukleus nach der Transfektion der Expressionsplasmide nach Mitomycin C (MMC)-Behandlung. Der Mittelwert von p53wt wurde auf 100% festgesetzt und entspricht absolut 1,2 Foci. Die Anfertigung der Graphen erfolgte mit GraphPad Prism. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (**** $p < 0{,}0001$; *** $p < 0{,}001$), Fehlerbalken +/- SEM (standard error of the mean). Abbildung (**B**) zeigt repräsentativ die gefärbten Nuklei inklusive PLA-Foci. Die Skala entspricht 5 µm. Die Kontrolle wurde ohne primären Antikörper (AK) durchgeführt. Die obere Reihe entspricht der gemeinsamen Aufnahme von DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol) - gefärbtem Nukleus und PLA-Foci. Die untere Reihe zeigt nur die PLA-Foci.

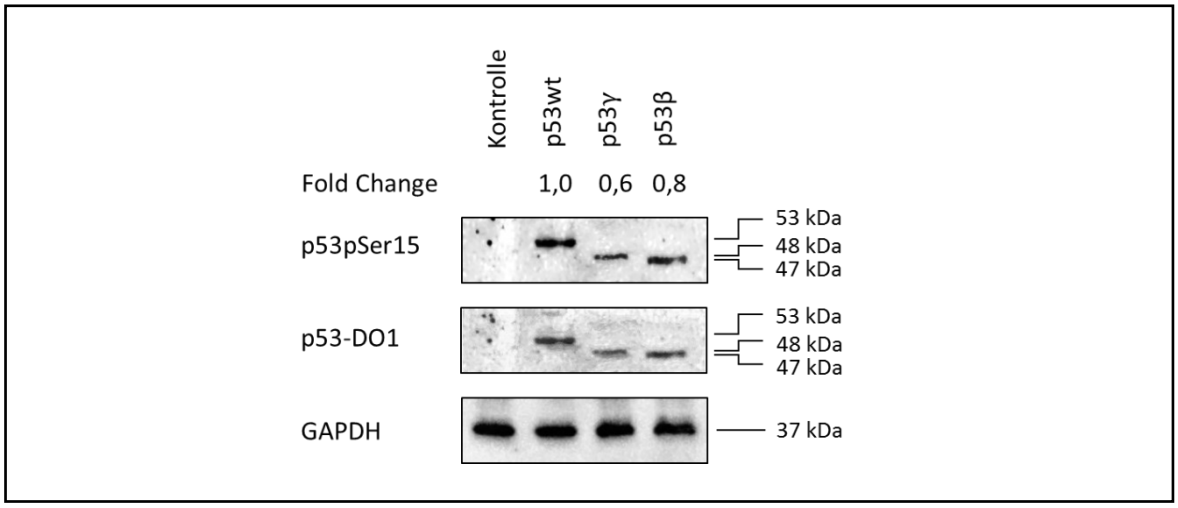

Abbildung 8 **Western Blot zum Nachweis von p53pSer15**

Für den Western Blot wurden K562-Zellen mit den Expressionsplasmiden p53wt (Wildtyp) (10 µg), p53γ (60 µg) und p53β (5 µg) transfiziert. Zur Kontrolle diente pcDNA (10 µg). Nach 48 h Inkubationszeit wurden die Proteine geerntet und der Western Blot angefertigt. Die Proteindetektion erfolgte mit dem primären Antikörper p53-DO1 und p53pSer15. Das phosphorylierte Protein steht im Zusammenhang mit gestoppten Replikationsgabeln und wurde in meinem Versuchsaufbau zum PLA (Proximity Ligation Assay) als Interaktionspartner für PCNA (Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen) und POLι (Polymerase iota) verwendet. Die Ladekontrolle erfolgt mit GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase). Angabe der Proteingröße in Kilodalton (kDa). Zur Quantifizierung wurde die Proteine mittels Image Lab densitometrisch analysiert und auf die Ladekontrolle normalisiert. Angabe der Fold Change über den Western Blot Panels. Das Protein p53wt wurde als 1 definiert.

3.4 Die Beeinflussung der DNA-Elongation durch p53 und seine Isoformen

Der DNA-Fiber-Spreading-Assay ermöglicht es uns, die DNA-Replikation bzw. die Dynamik der Replikationsgabel auf molekularer Ebene zu erforschen. Stephanie Biber [41, 42] konnte zeigen, dass Replikationsblockaden p53-abhängig zu einer Verlangsamung der DNA-Elongation führen, was sich wiederum in verkürzten DNA-Strängen im DNA-Fiber-Spreading-Assay wiederspiegelt.

Für meinen Versuchsaufbau wurden wieder K562-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden p53wt, p53β, p53γ und pcDNA (Kontrolle) transfiziert und nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Nukleotidanaloga 5-Chloro-2'-Deoxyuridin (CldU) und 5-Iodo-2'-Deoxyuridin (IdU) mit einer Inkubationszeit von je 20 min eingebaut. Der DNA-Fiber-Spreading-Assay wurde wie bereits im Methodenteil beschrieben durchgeführt.

In Abbildung 9 (B) sehen wir, dass die Expression von p53wt ($p < 0{,}0001$) ebenso wie von seine Isoformen p53β ($p < 0{,}0001$) und p53γ ($p < 0{,}0001$) im Vergleich zur Negativkontrolle zu einer Verkürzung der DNA-Tracks führt. Dieser Effekt ist sowohl bei CldU-markierten wie auch bei den IdU-markierten DNA-Tracks zu beobachten.

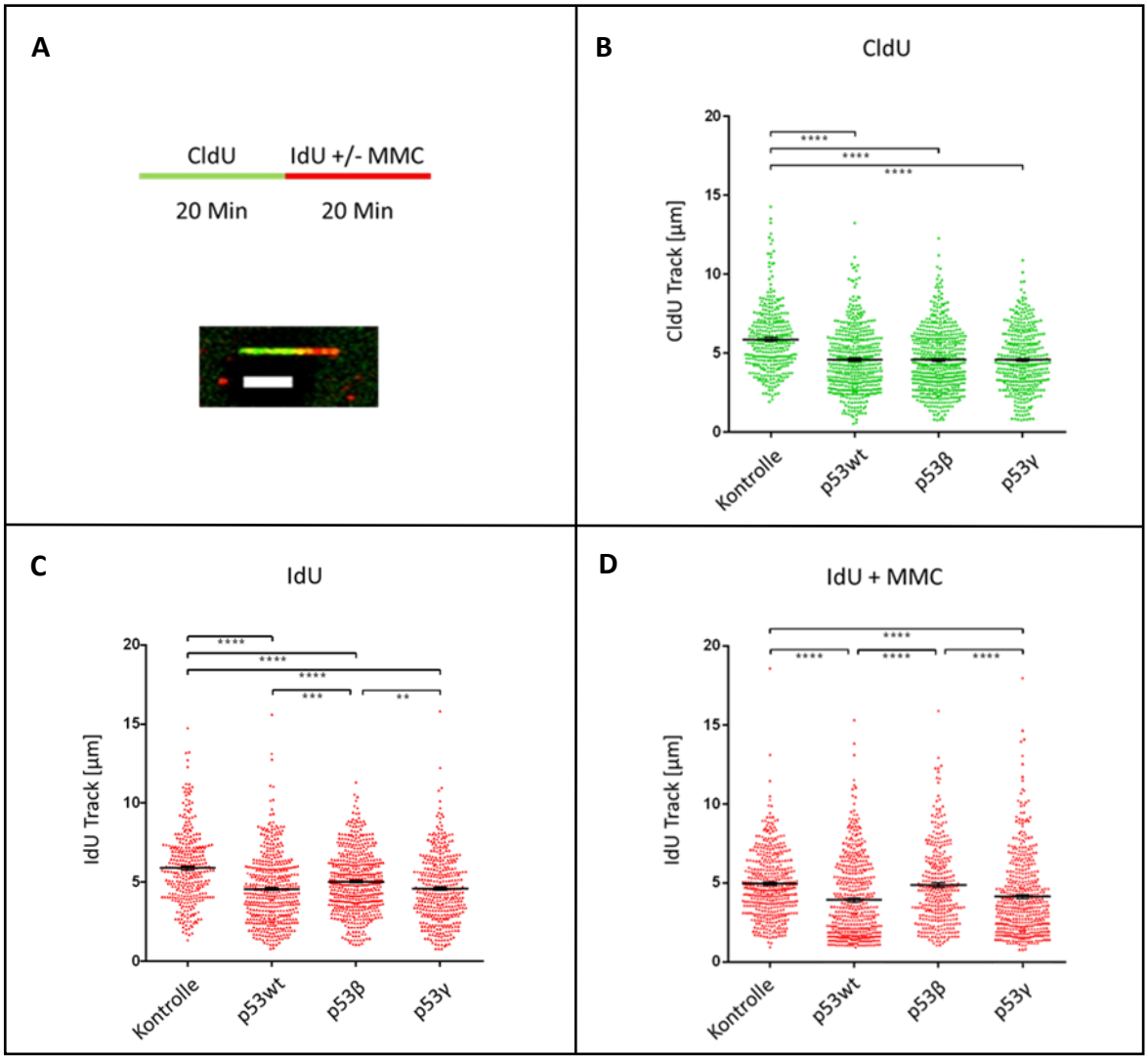

Abbildung 9 **Analyse der DNA-Track-Länge mittels DNA-Fiber-Spreading-Assay nach der Transfektion von p53-Expressionsplasmiden**

(**A**) Schematische Darstellung eines DNA-Tracks sowie ein repräsentativer Ausschnitt aufgenommen mit dem Fluoreszenzmikroskop. Die Skala entspricht 5 µm.

Für den DNA-Fiber-Spreading-Assay wurden zunächst K562-Zellen mit den p53-Expressionsplasmiden (10 µg) p53wt (Wildtyp), p53β, p53γ oder pcDNA (Kontrolle) transfiziert und für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erst mit CldU (5-Chloro-2'-Deoxyuridine)-haltigem Medium (20 µM), dann mit IdU (5-Iodo-2'-Deoxyuridine)-haltigem Medium (200 µM) für jeweils 20 min behandelt. Nach der CldU-Behandlung (**B**) wurden bei der IdU-Behandlung zwei Ansätze, einer ohne MMC (Mitomycin C) (**C**) und einer mit 3 µM MMC (**D**) durchgeführt. Für die Zelllyse wurden 2 µl Zellen (1250 Zellen/µl) mit 6 µl Fiber-Lysepuffer (0,5% SDS, 200 mmol Tris–HCl (pH 7,4), 50 mmol EDTA) auf einem Objektträger vermengt, durch immer größer werdende kreisförmige Bewegungen leicht ausgestrichen und nach 6 Minuten durch das Aufrichten der Objektträger (20 – 30 °) auf diesem verteilt. Nach der Fixierung (5 min, 3:1 Methanol/Eisessig) und Denaturierung (1 h, 2,5 N HCL) konnte IdU mittels Anti-BrdU (Maus-Antikörper) sowie CldU mittels Anti-BrdU (Ratten-Antikörper) als primärer Antikörper markiert werden. Nach mehrmaligem Waschen folgte die Inkubation mit den sekundären Antikörpern AlexaFluor555 (Anti-Maus für IdU) und AlexaFluor488 (Anti-Ratte für CldU). Die DNA-Fiber wurden mit dem Keyence Mikroskop BZ-9000 bildlich festgehalten und mittels BZ-II Analyser ausgewertet. Insgesamt wurden zwei biologisch unabhängige Versuche durchgeführt und daraus insgesamt pro Expressionsplasmid ≥ 323 DNA-Tracks ausgemessen. Die Graphen wurden mit GraphPad Prism angefertigt. Die statistischen Signifikanzen wurden mit Hilfe des Dunn's Multiple Comparison Tests berechnet (**** $p < 0{,}0001$, *** $p < 0{,}001$, ** $p < 0{,}01$), Fehlerbalken +/- SEM (standard error of the mean).

Nach der CldU-Inkorporation sehen wir interessanterweise eine annähernd gleichmäßige Verkürzung ohne signifikanten Trend innerhalb vom Wildtyp (CldU: 4,58 µm) und seinen Isoformen (p53β CldU: 4,54 µm, p53γ CldU: 4,57 µm, Kontrolle CldU: 5,87 µm).

Nach der IdU-Inkorporation in Abbildung 9 (C) hingegen verkürzt p53β (IdU: 5,00 µm) im Vergleich zu p53wt (IdU: 4,56 µm, $p < 0{,}0006$) und p53γ (IdU: 4,60 µm, $p < 0{,}0065$) signifikant weniger. Allgemein lässt sich allerdings feststellen, dass die Manipulation des C-Terminus, ähnlich wie p53wt, zu einer Verkürzung der DNA-Tracks führt.

Durch die zusätzliche Behandlung mit MMC erhalten wir neben der Elongation unter normalen Bedingungen Informationen über das Fortschreiten der Replikationsgabel unter gentoxischem Stress. Daher behandelte ich die Zellen in einer parallelen Versuchsreihe zusätzlich zu IdU mit MMC. Der DNA-Crosslinker ist dafür bekannt, das Fortschreiten der Replikationsgabel unabhängig von p53 zu verlangsamen, was zu einer Verkürzung der DNA-Tracks führt. Dies zeigte Stephanie Biber in ihrer Doktorarbeit, in der durch die MMC-Behandlung eine Verkürzung der DNA-Tracks beobachtet werden konnte. Dieser Effekt wurde durch die gleichzeitige Expression von p53wt nochmals verstärkt.

In Abbildung 9 (D) ist zu sehen, dass es durch die Behandlung mit IdU und MMC wie erwartet bei der Kontrolle zu einer zunehmenden Verkürzung der DNA-Tracks kommt (Kontrolle IdU: 5,89 µm und IdU + MMC: 4,97 µm). Bei p53wt ($p < 0{,}0001$) und bei p53γ ($p < 0{,}0001$) lässt sich die Verkürzung der DNA-Tracks verglichen mit p53-negativen Zellen auch nach IdU und MMC-Behandlung verifizieren (p53wt IdU + MMC: 3,92 µm, p53γ IdU + MMC: 4,14 µm). Betrachten wir jedoch p53β (IdU + MMC 4,86 µm), so sehen wir mit der Negativkontrolle vergleichbar lange DNA-Tracks nach IdU- und MMC-Behandlung ohne signifikanten Unterschied. Dies bedeutet, dass p53β im Vergleich zu p53wt ($p < 0{,}0001$) und p53γ ($p < 0{,}0001$) die Fähigkeit zur DNA-Track-Verkürzung aufgrund der zusätzlichen MMC-Behandlung verliert.

Bei der Suche nach möglichen Ursachen für das variable Verhalten der p53-Isoformen fiel ein sehr unterschiedliches Expressionslevel der Isoformen auf, welche sich beim Proteinnachweis mittels Western Blot zeigten. In Abbildung 10 ist der Western Blot mit den bekannten Isoformen dargestellt. Trotz gleicher Beladung der Western Blot Gele (60 µg) fällt p53β im Vergleich zu p53wt auch nach Normalisierung auf die Ladekontrolle mit einer stärkeren Proteinexpression auf (Fold Change 1,4). Im Gegensatz dazu zeigt sich p53γ mit

einer sehr abgeschwächten Expression (Fold Change 0,1). Diese Unterschiede waren unabhängig von den im Western Blot eingesetzten Antikörpern zu beobachten.

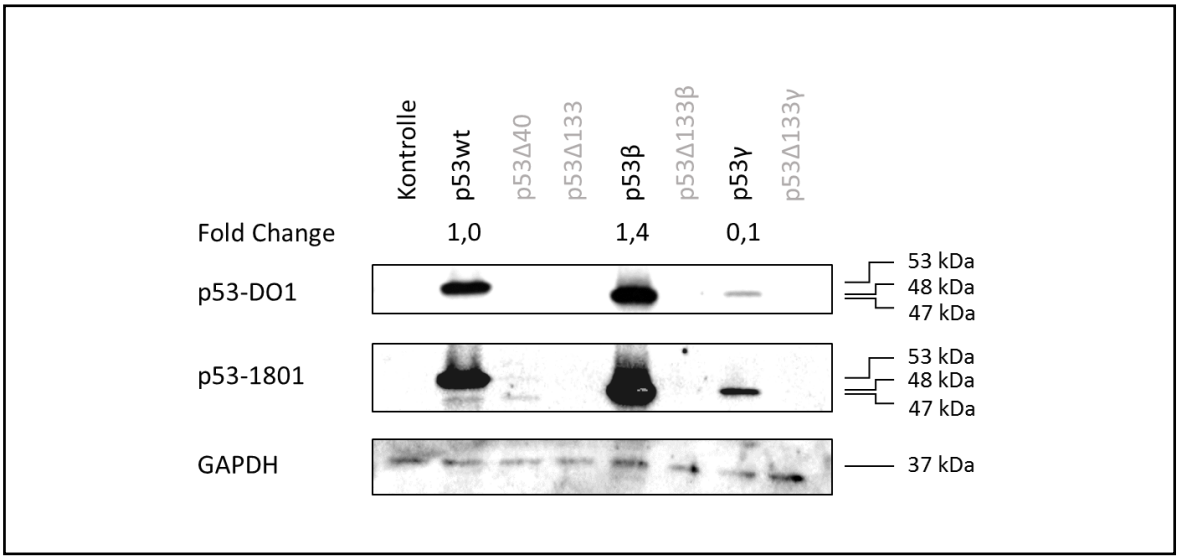

Abbildung 10 **Western Blot zum Proteinnachweis von p53wt, p53β und p53γ**

Zum Proteinnachweis wurden K562-Zellen zunächst mit 10 µg der gewünschten Expressionsplasmide (p53wt, p53β, p53γ) oder zur Kontrolle mit pcDNA elektroporiert und 48 h inkubiert. Zur Proteingewinnung wurden die Zellen lysiert. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung (25 mA/Gel) sowie die Übertragung auf eine Hybond-C-Extra Nitrocellulose Membran (40 min, 100 V). Nach der Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern ließen sich die Proteine per ChemiDoc Imaging System (Belichtungszeit 1-60 Sek) detektieren. Zur Quantifizierung wurde die Proteine mittels Image Lab densitometrisch analysiert und auf die Ladekontrolle normalisiert. Angabe der Fold Change über den Western Blot Panels. Das Protein p53wt wurde als 1 definiert.

Die Abbildung zeigt die Detektion mit den Antikörpern p53-Do1 sowie p53-1801. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) dient als Ladekontrolle. Angabe der Proteingröße in Kilodalton (kDa). Für die grau markierten p53 Isoformen, die ursprünglich mit in die Doktorarbeit einbezogen werden sollten, fanden sich keine passenden Antikörper. Daher wird auf sie nicht weiter eingegangen.

Um die Auswirkung der unterschiedlich starken Proteinexpressionen zu neutralisieren, habe ich eine Titration der eingesetzten Expressionsvektoren durchgeführt und die Proteinexpression mittels Western Blot bestimmt. Abbildung 11 zeigt sowohl für p53β als auch für p53γ die Titrationsreihe im Bezug zur p53wt-Proteinmenge. Entsprechend dem normalisierten Titrationsergebnis, angegeben in Fold Change, wählte ich eine Plasmidmenge von 5 µg p53wt als Äquivalenz zu 2,5 µg p53β + 2,5 µg pBS (Auffüllplasmid) und zur Kontrolle mit 5 µg pcDNA. p53γ wurde fortan mit einer Plasmidmenge von 60 µg verwendet. Dies entspricht in etwa 10 µg p53wt + 50 µg pBS und 10 µg pcDNA + 50 µg pBS. Denn, um einer eventuellen Verzerrung durch das Transfizieren von unterschiedlichen Plasmidmengen entgegenzuwirken, wurden die Zellen teilweise zusätzlich zum eigentlichen Expressionsplasmid mit einem Leervektor (pBS) transfiziert. Für die weiteren Versuche wurden die titrierten Plasmidmengen wie angegeben verwendet.

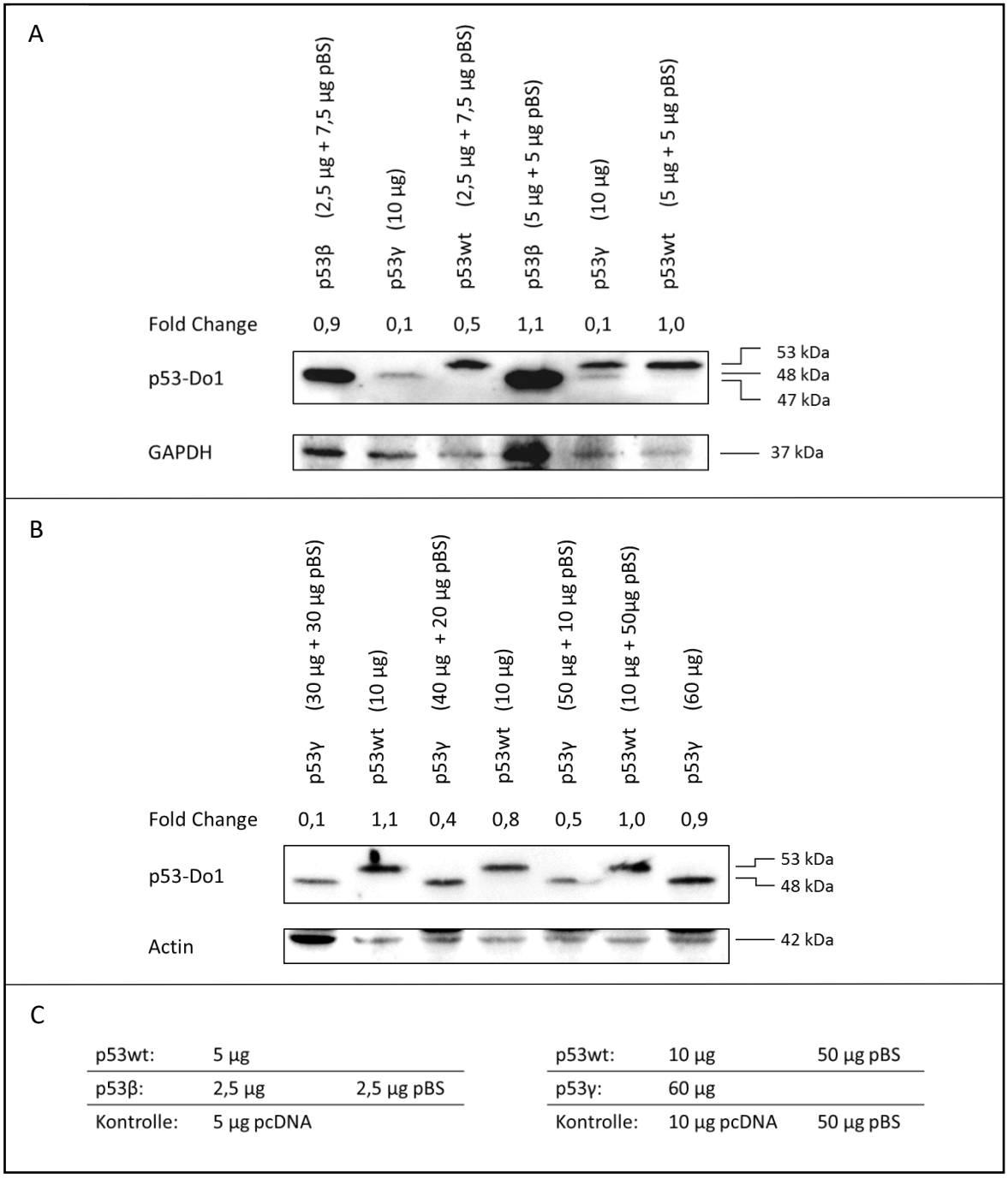

Abbildung 11 **Western Blot Titrationsreihe mit p53wt, p53β und p53γ**

Der Western Blot wurde wie zuvor beschrieben angefertigt. Für die Titrationsreihe wurden die SDS (Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamidgele mit Proteinextrakten von unterschiedlichen DNA-Mengen beladen (Mengenangabe in Klammern). Da zum Teil sehr unterschiedliche Expressionsplasmidmengen verwendet wurden, wurde für die Elektroporation die DNA-Gesamtmenge mit einem Leervektor pBS (pBlueScript II KS +/-) angeglichen. Als primärer Antikörper wurde p53-Do1 verwendet. Die Ladekontrolle wurde mit GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) und Actin durchgeführt. Angabe der Proteingröße in Kilodalton (kDa). Zur Quantifizierung wurde die Proteine mittels Image Lab densitometrisch analysiert und auf die Ladekontrolle normalisiert. Angabe der Fold Change über den Western Blot Panels.

Abbildung (**A**) zeigt den Western Blot von p53wt (Wildtyp), p53β und p53γ mit unterschiedlichen Konzentrationen. Für die Angabe der Fold Change wurde p53wt (5 µg + 5 µg pBS) als 1 definiert. In der fünften Spalte handelt es sich bei der oberen Bande um einen Pipettierfehler. Abbildung (**B**) bildet die Titrationsreihe mit p53wt und p53γ ab. Für die Angabe der Fold Change wurde p53wt (10 µg + 50µg pBS) als 1 definiert. Abbildung (**C**) zeigt die für die weiteren Versuche ausgewählten Proteinmengen.

3.5 Die Beeinflussung der DNA-Elongation durch p53 und seine Isoformen nach der Titration

In den Abbildungen 12a und 12b sind die Ergebnisse der DNA-Fiber-Spreading-Assays nach der Plasmidtransfektion mit titrierten Konzentrationen in K562-Zellen dargestellt. In Abbildung 12a sehen wir wieder, dass es während der Inkubation mit CldU-Nukleotiden durch p53wt im Vergleich zur Kontrolle zu einer Verkürzung der DNA-Tracks kommt (Kontrolle CldU: 5,39 µm, p53wt CldU: 3,49 µm, $p < 0,0001$). Auch bei der Expression von p53β sind die CldU-DNA-Tracks im Vergleich zur Kontrolle verkürzt (p53β CldU: 4,23 µm, $p < 0,0001$), hier ist der Effekt jedoch weniger ausgeprägt als beim Wildtyp ($p < 0,0001$).

Durch die anschließende Inkubation mit IdU-Nukleotiden sowie MMC ergibt sich eine zunehmende Verkürzung innerhalb der Kontrollgruppe (Kontrolle IdU + MMC: 4,30 µm, $p < 0,0001$) und innerhalb von Proben mit der Isoform p53β (p53β IdU + MMC: 3,36 µm, $p < 0,0001$). Betrachtet man p53wt nach der Inkorporation mit IdU und MMC, so sehen wir auch hier verkürzte DNA-Tracks (p53wt IdU + MMC: 2,9 µm). Der Unterschied von p53wt zu dem weniger verkürzendem p53β bleibt uns bei den IdU-Tracks erhalten ($p < 0,0182$).

In Abbildung 12b sehen wir die Ergebnisse des DNA-Fiber-Spreading-Assays mit der Isoform p53γ nach der Titration. Wie bereits in Abbildung 12a gezeigt, führt die Expression von p53wt zu einer Verkürzung der DNA-Tracks im Vergleich zur Negativkontrolle. Diesen Effekt sehen wir wieder bei den CldU-DNA-Tracks (Kontrolle CldU: 6,90 µm, p53wt CldU: 3,63 µm, $p < 0,0001$) wie auch bei den IdU-DNA-Tracks nach MMC Behandlung (Kontrolle IdU + MMC: 5,70 µm, p53wt IdU + MMC: 2,88 µm, $p < 0,0001$). Darüber hinaus kommt es durch die MMC-Behandlung innerhalb der Kontrollproben ($p < 0,0096$) und p53wt exprimierenden Proben ($p < 0,0015$) zu einer zunehmenden DNA-Track-Verkürzung.

Das gleiche Phänomen ist bei der Expression von p53γ zu beobachten. Auch hier sind in Bezug auf die jeweilige Negativkontrolle die CldU-DNA-Tracks (CldU: 2,91 µm, $p < 0,0001$) und IdU-DNA-Tracks nach MMC-Behandlung (IdU + MMC: 2,51 µm, $p < 0,0001$) verkürzt. Die durch die CldU-Inkorporation von p53γ transfizierten Zellen entstehenden DNA-Tracks sind im Vergleich zum Wildtyp nochmals stärker verkürzt ($p < 0,0170$). Interessanterweise führt die MMC-Behandlung hier jedoch zu keiner zusätzlichen Track-Verkürzung, sodass nach der IdU-Inkorporation mit MMC-Behandlung kein signifikanter Unterschied zwischen p53wt und p53γ mehr besteht.

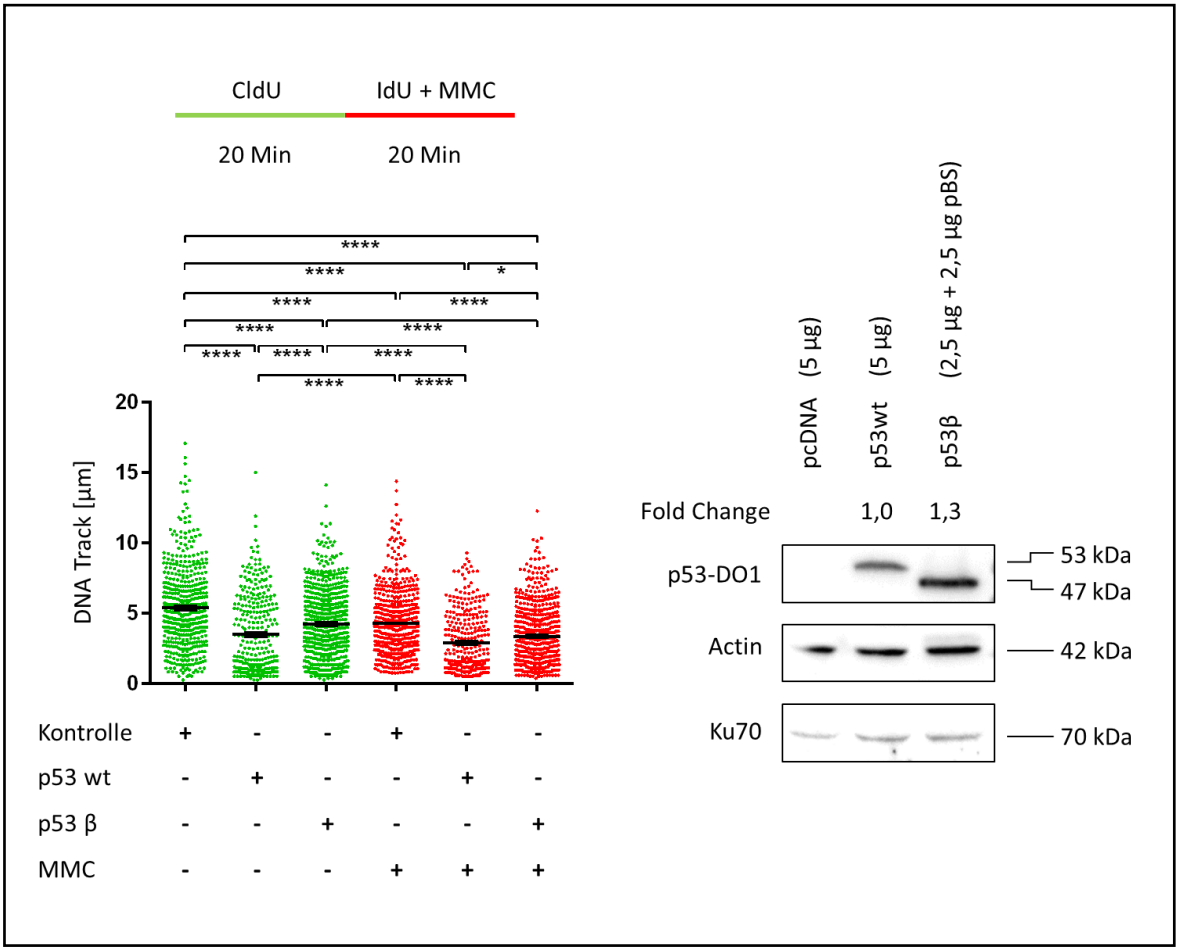

Abbildung 12a **Analyse der DNA-Track-Länge mittels DNA-Fiber-Spreading-Assay nach der Transfektion des p53β-Expressionsplasmids mit angepasster Konzentration**

Zur Vorbereitung wurden K562-Zellen mit den Expressionsplasmiden p53wt (Wildtyp), p53β oder pcDNA (Kontrolle) transfiziert. Die Konzentrationen wurden entsprechend des Titrationsergebnisses gewählt: p53wt 5 µg, p53β 2,5 µg + 2,5 µg pBS (pBlueScript II KS +/-), pcDNA 5 µg. Der DNA-Fiber-Spreading-Assay wurde wie in Abbildung 9 beschrieben durchgeführt. Die Behandlung erfolgte mit CldU (5-Chloro-2'-Deoxyuridine)-haltigem Medium (20 µM) und anschließend mit IdU (5-Iodo-2'-Deoxyuridine)-haltigem Medium (200 µM) + 3 µM MMC (Mitomycin C) für jeweils 20 min. Nach der Antikörpermarkierung (IdU mittels Anti-BrdU [Maus] sowie AlexaFluor555 [Anti-Maus], CldU mittels Anti-BrdU [Ratte] sowie AlexaFluor488 [Anti-Ratte]) erfolgte die Auswertung mit dem Keyence Mikroskop BZ-9000 sowie dem BZ-II Analyser. Insgesamt wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt und daraus insgesamt pro Expressionsplasmid ≥ 310 DNA-Tracks ausgemessen. Die Graphen wurden mit GraphPad Prism angefertigt. Die statistischen Signifikanzen wurden mit Hilfe des Dunn's Multiple Comparison Tests berechnet. (**** $p < 0{,}0001$; ** $p < 0{,}01$; * $p < 0{,}05$), Fehlerbalken +/- SEM (standard error of the mean).

Nebenstehend ist der zugehörige Western Blot abgebildet. Die Expressionsplasmide sind mit ihren Konzentrationen angegeben. Als primäre Antikörper wurden p53-DO1, als Ladekontrolle Actin und Ku70 verwendet. Angabe der Proteingröße in Kilodalton (kDa). Zur Quantifizierung wurde die Proteine mittels Image Lab densitometrisch analysiert und auf die Ladekontrolle (Ku70) normalisiert. Angabe der Fold Change über den

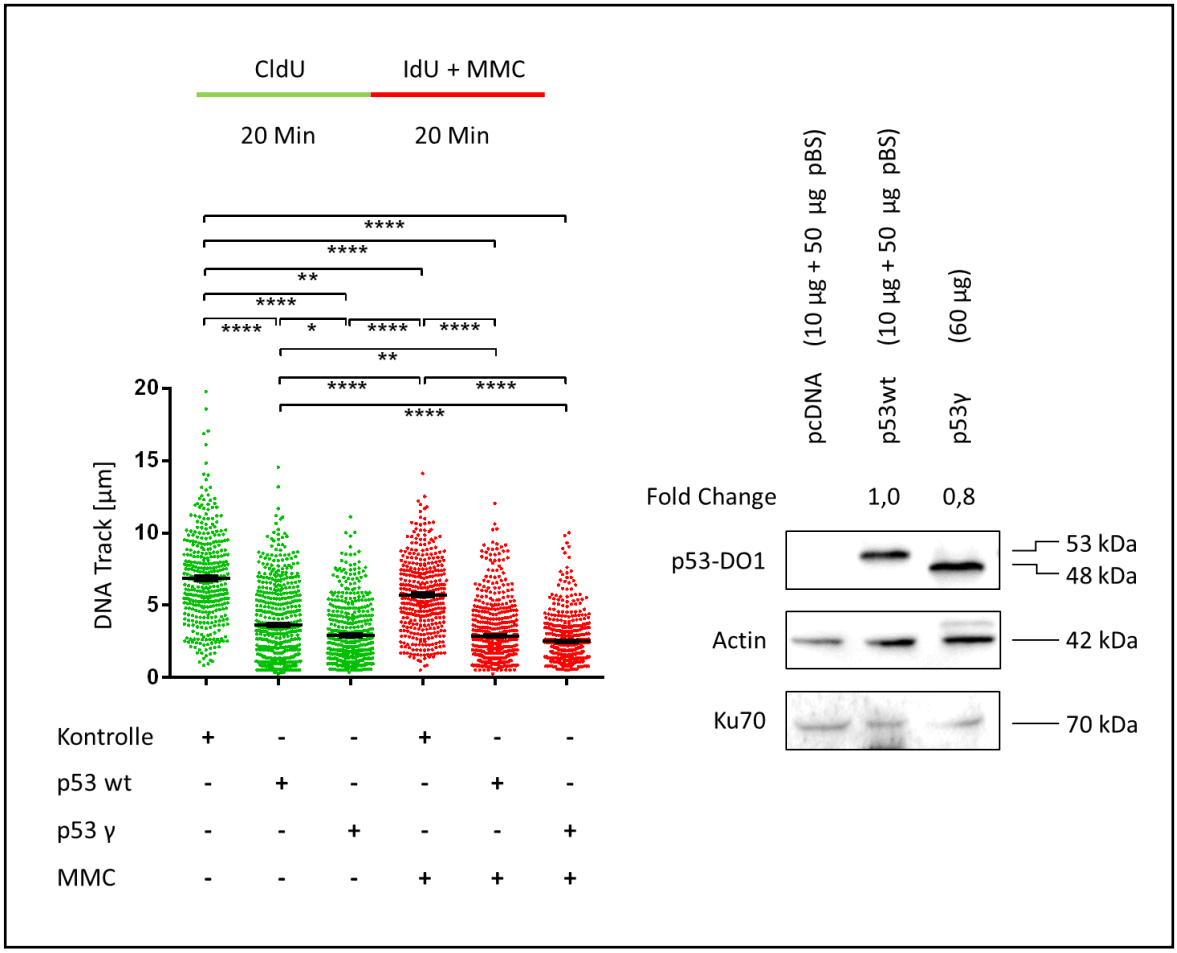

Abbildung 12b **Analyse der DNA-Track-Länge mittels DNA-Fiber-Spreading-Assay nach der Transfektion des p53γ-Expressionsplasmids mit angepasster Konzentration**

Zur Vorbereitung wurden K562-Zellen mit den Expressionsplasmiden p53wt (Wildtyp), p53γ oder pcDNA (Kontrolle) transfiziert. Die Konzentrationen wurden entsprechend des Titrationsergebnisses gewählt: p53wt 10 µg + 50 µg pBS (pBlueScript II KS +/-), p53γ 60 µg, pcDNA 10 µg + 50 µg pBS. Der DNA-Fiber-Spreading-Assay wurde wie in Abbildung 9 beschrieben durchgeführt. Die Behandlung erfolgte mit CldU (5-Chloro-2'-Deoxyuridine)-haltigem Medium (20 µM) und anschließend mit IdU (5-Iodo-2'-Deoxyuridine)-haltigem Medium (200 µM) + 3 µM MMC (Mitomycin C) für jeweils 20 min. Nach der Antikörpermarkierung (IdU mittels Anti-BrdU [Maus] sowie AlexaFluor555 [Anti-Maus], CldU mittels Anti-BrdU [Ratte] sowie AlexaFluor488 [Anti-Ratte]) erfolgte die Auswertung mit dem Keyence Mikroskop BZ-9000 sowie dem BZ-II Analyser. Insgesamt wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt und daraus insgesamt pro Expressionsplasmid ≥ 394 DNA-Tracks ausgemessen. Die Graphen wurden mit GraphPad Prism angefertigt. Die statistischen Signifikanzen wurden mit Hilfe des Dunn's Multiple Comparison Tests berechnet. (**** $p < 0{,}0001$; ** $p < 0{,}01$; * $p < 0{,}05$), Fehlerbalken +/- SEM (standard error of the mean).

Nebenstehend ist der zugehörige Western Blot abgebildet. Die Expressionsplasmide sind mit ihren Konzentrationen angegeben. Als primäre Antikörper wurden p53-DO1, als Ladekontrolle Actin und Ku70 verwendet. Angabe der Proteingröße in Kilodalton (kDa). Zur Quantifizierung wurde die Proteine mittels Image Lab densitometrisch analysiert und auf die Ladekontrolle (Ku70) normalisiert. Angabe der Fold Change über den Western Blot Panels.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass nach angepasstem Proteinexpressionslevel sowohl p53wt, als auch die Isoformen p53β und p53γ zu einer Verkürzung der DNA-Tracks im DNA-Fiber-Spreading-Assay führen. p53β verkürzt etwas weniger, p53γ mindestens so stark wie p53wt. Diese Verkürzungseffekte sind auch nach Behandlung mit dem Crosslinker MMC zu beobachten.

Neben der Auswertung des jeweiligen DNA-Fiber-Spreading-Assays findet sich der zugehörige Western Blot mit ebenfalls angepassten Proteinmengen. Wie an der Fold Change zu sehen ist, haben sich die Proteinmengen im Vergleich zur vorherigen untitrierten Versuchsreihe angenähert.

4 Diskussion

4.1 Stimulationsverlust der Isoformen p53β und p53γ bei der replikations-assoziierten Rekombination

Das Protein p53 stimuliert die SR, welche für die Überwindung von endogenen Replikationsblockaden und damit dem Erhalt der Genomstabilität wichtig ist. Um den Mechanismus im Detail zu verstehen, untersuchte ich neben p53 auch das Stimulationsverhalten der Isoformen p53β und p53γ mit verändertem C-Terminus. Bei der Messung der Rekombinationsfrequenz konnte ich die p53-abhängige Stimulation verifizieren. Die p53-Isoformen p53β und p53γ wiesen jedoch beide einen signifikanten Verlust der Rekombinationsfrequenz auf, wodurch man auf einen Verlust der Stimulationsfähigkeit schließen kann. Das Ergebnis lässt vermuten, dass auch angepasste Proteinmengen der Isoformen den Stimulationsverlust nicht bedeutend vermindern können. Das heißt, der veränderte C-Terminus beziehungsweise das Fehlen der OD und der CTD haben allem Anschein nach einen Einfluss auf die Rekombinationsstimulation. Die OD ist entscheidend für die Tetramerisierung von p53, um so die aktive Form des Proteins zu bilden [23]. Darüber hinaus erleichtert sie durch die Interaktion mit der DBD die DNA-Bindung selbst [26]. Die CTD ist bekannt für die unspezifische Bindung einer Vielzahl an DNA-Strukturen, die im Zusammenhang mit DNA-Schäden stehen [2, 26, 69, 76]. Außerdem beeinflusst sie die Stabilität sowie die Lokalisierung von p53, das Rekrutieren von Co-Faktoren und die sequenzspezifische DNA-Bindung [26, 69, 94]. Aus den Ergebnissen der Versuchsreihe lässt sich die Hypothese ableiten, dass eine oder mehrere dieser Funktionen für die Stimulation der HR zum Bypass von Hindernissen an der Replikationsgabel notwendig sind.

Im Hinblick auf die Unterdrückung der HR zeigten Dudenhöffer et al. 1999 [30], dass sowohl bei einer Mutation der DBD, als auch unabhängig davon beim Verlust der OD die Suppression der HR ausbleibt. Fehlen p53wt jedoch nur die letzten 30 Aminosäuren und damit die CTD, so ist eine HR-Unterdrückung nach wie vor möglich. Dies spricht für eine Beteiligung der DBD und der OD, nicht aber der CTD bei der Rekombinationsregulation. Sollte diese Beobachtung auch für die HR-Stimulation gelten, wäre dies eine mögliche Erklärung, warum mit dem Verlust der OD bei den Isoformen p53β und p53γ auch der stimulierende Effekt verloren geht. Mit anderen Worten wäre somit die Fähigkeit der OD

zur Tetramerisierung ein wichtiger Beitrag zur HR-Stimulation, was auch aktuelle Daten von Biber et al. 2020 vermuten lassen [15].

Da das Protein p53wt seine Funktion bekanntermaßen als Tetramer ausübt und den Isoformen die hierfür benötigte OD fehlt, stellt sich die Frage, auf welche Art die Isoformen ihre Funktion generell ausüben. Hierbei finden sich in der Literatur unterschiedliche Aussagen. Graupner und Kollegen [39] zeigten, dass die Isoformen weder eine Oligomerisierung eingehen können, noch dass sie zur DNA-Interaktion oder p53wt-Interaktion fähig sind. Somit könnten p53β und p53γ die Apoptose, Seneszenz und Transkription nicht beeinflussen. Auch Flaman et al. 1996 [33] beschrieben, dass durch den fehlenden C-Terminus sowohl die DNA-Bindung *in vitro* als auch die Transkription *in vivo* verhindert werden würde.

Durch eine Vielzahl an Versuchen fanden Bourdon et al. 2005 [21] und Khoury et al. 2011 [59] allerdings Hinweise darauf, dass die Isoformen p53β und p53γ sowohl indirekt durch p53wt als auch direkt eine DNA-Bindung eingehen und die Transkription beeinflussen können. Mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) zeigten sie, dass p53β unabhängig von p53wt bevorzugt die normalerweise p53-abhängigen Promotoren BAX und p21 bindet. Durch die gemeinsame Transfektion von p53wt und p53β steigert sich interessanterweise die Aktivität des BAX-Promotors, nicht aber des p21-Promotors. Bei der Ko-Immunpräzipitation zeigte sich, dass p53wt und p53β einen Proteinkomplex eingehen können und die Vermutung liegt nahe, dass dieser spezifisch an einen Teil der p53-abhängigen Promotoren binden kann. Somit wäre es möglich, dass p53β spezifisch die p53wt-vermittelte Transkriptionsaktivität von Promotoren beeinflusst. Auch bei der durch p53 induzierten Expression von p21 in Fibroblasten, die zur Seneszenz führt, scheint p53β einen Einfluss zu haben [35, 59].

Neben der Beeinflussung der p53-abhängigen Transkriptionsaktivität durch selektive Promotorenbindung, reguliert p53β die Genexpression bemerkenswerterweise auch unabhängig von p53wt, da es auch in Abwesenheit von p53wt DNA binden kann. Ein Beispiel hierfür ist die unabhängige Induktion der Apoptose [21, 59].

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Isoformen p53β und p53γ durch den verkürzten C-Terminus einen Teil der Funktionen vom Wildtyp eingebüßt haben. Durch die fehlende OD und CTD findet keine Stimulation der HR mehr statt, wobei die naheliegendste

Erklärung die fehlende Tetramerisierung zu sein scheint. Trotz des veränderten C-Terminus können die Isoformen jedoch unabhängig oder durch p53wt vermittelt auf Mechanismen wie die Transkription, den Zellzyklus, die Seneszenz und Apoptose einwirken.

4.2 Reduzierte Assoziation von PCNA und den p53-Isoformen

PCNA ist ein wichtiger Co-Faktor bei der DNA-Replikation und Reparatur. Mit seiner Ringstruktur umgibt es die DNA, koordiniert und interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen, die bei der Zellzyklusregulation und der Checkpoint-Kontrolle mitwirken und erhöht so die Prozessivität [56]. Auch bei der Überwindung von endogenen Replikationsblockaden, um das Fortschreiten der Replikationsgabel zu gewährleisten, ist das Mitwirken von p53 und PCNA nötig. Bei der Erforschung des Bypassmechanismus konnte von Stephanie Biber und Tina Kießling mittels PLA und Ko-Immunpräzipitation eine physische und funktionale Interaktion von p53 und PCNA aufgezeigt werden [42, 61]. In meiner PLA-Versuchsreihe (Abbildung 6) mit PCNA und den p53-Isoformen fanden sich bei p53wt und p53β eine Assoziation in Form von PLA(p53pSer15/PCNA)-Foci im Zellkern, zu der p53γ nicht mehr fähig zu sein scheint. Wird der Versuch um die Behandlung der Zellen mit MMC erweitert, zeigen sich bei der Auswertung für p53β wie auch für p53γ PLA(p53pSer15/PCNA)-Foci und damit eine Assoziation mit PCNA im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Assoziation war jedoch deutlich schwächer als bei p53wt. Beim Vergleich der absoluten Zahlen ist zu sehen, dass durch MMC die Foci-Anzahl nach der Transfektion von p53wt und p53γ, nicht jedoch von p53β ansteigt. Eine mögliche Erklärung ist, dass erst durch die Art oder Anzahl der zusätzlich verursachten DNA-Schäden, der partielle Defekt von p53β demaskiert wird.

Beide Isoformen besitzen aufgrund von alternativem Splicen keine OD und keine CTD. Ihr alternativer C-Terminus beinhaltet dafür 10 bzw. 15 zusätzliche Aminosäuren. Im veränderten C-Terminus muss also nicht nur die Erklärung für den im Vergleich zu p53wt existierenden Funktionsverlust bei der Rekombinationsstimulation zu finden sein, sondern auch die Erklärung für ein unterschiedliches Verhalten bei der Assoziation mit PCNA.

Der Versuch, eine p53γ-exprimierende Zelllinie zu generieren, gestaltete sich schwierig, wodurch die Hypothese entstand, dass p53γ zytotoxische Eigenschaften besitzt [59, 94]. Dies wäre eine mögliche Begründung dafür, dass das zelluläre Expressionslevel von p53γ stets sehr gering ausfällt [21]. Wie bereits in der Fiber-Versuchsreihe angesprochen,

erscheint es auch für die PLA-Versuche sinnvoll, mit angepassten Proteinmengen zu arbeiten. So ließe sich möglicherweise das Assoziationsdefizit von p53γ mit PCNA zumindest im Vergleich zu p53β ausgleichen, was einen nicht zu unterschätzenden Zuwachs bedeuten würde. Somit ist das geringe Proteinlevel und die Zytotoxizität von p53γ eine mögliche Begründung für die fehlende Assoziation mit PCNA.

Ruft man sich in Erinnerung, dass bei beiden Isoformen die OD zur Tetramerisierung fehlt, wäre auch die veränderte Proteinstruktur und die damit eingeschränkte Interaktion mit Proteinen und der DNA eine mögliche Ursache. So scheint es als wahrscheinlich, dass eine kooperative DNA-Bindung von PCNA sowie von p53 und seinen Isoformen zur Komplexbildung notwendig ist. Andersherum gesagt, beeinflusst eine veränderte DNA-Bindungsfähigkeit der p53-Isoformen auch gleichermaßen die Assoziation mit PCNA.

Banks et al. 2006 [9] zeigten, dass p53 über seinen N-Terminus (Aminosäuren 16-23) mit PCNA interagiert. Diese und weitere potenziell wichtige Bindungspartner sind bereits in Abbildung 4 dargestellt worden. Auch für MDM2 sind Bindestellen am N-Terminus von p53 (Aminosäuren 17-27) [66], aber auch am C-Terminus (Aminosäuren 367-393) beschrieben [24, 80]. Darüber hinaus besitzt MDM2 auch eine eigene Bindestelle für PCNA-Interaktionen [9]. Dies lässt vermuten, dass MDM2 die Bindung von p53 an PCNA mit beeinflussen kann. Wie Klusmann et al. 2016/2018 bereits beschrieben haben, ist MDM2 bei der Regulation der Replikation beteiligt [63, 64]. Man könnte also spekulieren, dass die Aktivierung von MDM2 der Rekrutierung von p53 an die Replikationsgabel vorgeschaltet ist und MDM2 so dabei hilft, p53 an die Replikationsgabel zu führen. Des Weiteren wurde von Kaustov et al. 2006 gezeigt, dass der C-Terminus einen kleinen positiven Einfluss auf die RPA-Bindung von p53 hat [55]. RPA ist ein wichtiger Faktor für die Replikation und Rekombination und möglicherweise ähnlich wie PCNA wichtig für die Interaktion verschiedener Proteine sowie für die Rekrutierung von p53 an die Replikationsgabel. Es konnte gezeigt werden, dass RPA und p53 (Aminosäuren 38 – 58) zur Komplexbildung fähig sind [85].

Zusammengefasst lässt sich eine gestörte Assoziation von p53γ und tendenziell auch von p53β mit PCNA feststellen. Eine mögliche Begründung ist die aufgrund der Proteinstruktur verminderte DNA-Bindungsfähigkeit von p53β und p53γ. Aber auch der zum Teil extranuklearen Lokalisation und dem geringen stabil nachweisbaren Expressionslevel von

p53γ sollten Beachtung geschenkt werden. Außerdem kann der C-Terminus bei der Rekrutierung durch andere beziehungsweise von anderen wichtigen Proteinen in der DNA-Replikation eine Rolle spielen.

4.3 Fehlende Assoziation von POLι und den p53-Isoformen

DNA-Polymerasen spielen eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation. Dabei kann man replikative Polymerasen mit hoher Genauigkeit von speziellen Polymerasen wie die POLι mit hoher Fehleranfälligkeit unterscheiden [31, 73]. Stoßen die replikativen Polymerasen auf ein Replikationshindernis, ist es durch den Wechsel zu speziellen Polymerasen möglich, dieses zu überwinden [53, 54]. Die Relevanz von POLι bei der Überwindung von Replikationsblockaden durch einen neuartigen DNA-Toleranzmechanismus verifizierte Stephanie Biber in ihrer Doktorarbeit [41]. Mit Hilfe einer Ko-Immunpräzipitation bewies sie die Interaktion von p53wt und POLι. Bei den p53-Isoformen kam es jedoch im PLA bei p53β nur zu einem geringgradigen POLι-Foci-Anstieg, bei p53γ waren keine POLι-Foci detektierbar (Abbildung 6). Zunächst wäre auch hier ein Versuchsaufbau mit angepassten Proteinmengen sinnvoll, um die unterschiedliche Proteinexpression als Ursache für die beobachteten Unterschiede auszuschließen. Im Vergleich zum PLA (p53pSer15/PCNA) ist der Assoziationsverlust von beiden Isoformen mit POLι nochmal ausgeprägter. Das heißt, die Proteinquantität ist als alleinige Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse nicht ausreichend. Jedoch stellt sich die Frage, ob der Unterschied zwischen den Isoformen hierin begründet liegt. So zeigt sich für die nur schwach exprimierte Isoform p53γ in beiden PLA-Versuchsreihen im Vergleich zu p53β eine verminderte Assoziation.

Es ist aber auch zu diskutieren, ob nicht die Bindung von p53 an die DNA eine Vorrausetzung für die Komplexbildung mit POLι darstellt. Dies könnte durch den Vergleich von einer ChIP mit einer IP näher untersucht werden. Interessanterweise war die Interaktion von p53wt und POLι in der IP an die Exonukleasefunktion von p53 geknüpft. Zu überlegen wäre, ob auch der C-Terminus selbst für die Assoziation mit POLι benötigt wird. In der Literatur wurden bereits mehrere Interaktionen von p53 und Polymerasen bewiesen. So benötigt auch der Komplex von p53 und der DNA-Polymerase α einen intakten C-Terminus [65]. Das aber auch andere Abschnitte von p53 wichtig sein können, zeigte die Entdeckung der Interaktion der RNA-Polymerase II mit der DNA-bindenden Domäne [62] sowie eines vom N-Terminus abhängigen p53/DNA-Polymerase-β-Komplexes [99]. Ganz aktuell fanden sich

Hinweise darauf, dass auch die Interaktion von p53 und POLι im N-Terminus von p53 lokalisiert ist [15]. Insgesamt scheint aber der C-Terminus, wie bereits bei der Rekombinationsstimulation und der Assoziation mit PCNA gesehen, auch die Assoziation von p53 mit POLι zu beeinflussen.

4.4 Verkürzte DNA-Elongation von p53 und seinen Isoformen

In Hampp et al. 2016 [42] wird der Bypass von Replikationsblockaden beschrieben, bei dem durch POLι und der p53-Exonuklease ein Leerlauf bei der Nukleotidpolymerisation entsteht, der wiederum zu einem verlangsamten Fortschreiten der Replikationsgabel führt. Im DNA-Fiber-Spreading-Assay kann dies durch verkürzte DNA-Tracks quantifiziert werden. In meiner ersten Versuchsreihe (Abbildung 9) führte nicht nur die Transfektion von p53wt, sondern auch die Transfektion der beiden Isoformen p53β und p53γ zu einer Verkürzung der DNA-Tracks. Bei p53γ war der verkürzende Effekt sowohl bei unbehandelten Zellen sowie nach MMC-Behandlung konstant reproduzierbar. Die Verkürzung durch p53γ ist annähernd mit der durch p53wt vergleichbar.

Bei p53β zeigte sich zunächst ebenfalls eine Verkürzung der DNA-Tracks. Nach der zusätzlichen MMC-Behandlung war die Verkürzung bemerkenswerterweise weniger stark ausgeprägt, was zunächst ungewöhnlich erscheint. Bei der Kontrolle der Proteinexpressionslevel mittels Western Blot fiel jedoch eine erhöhte Proteinmenge von p53β und eine verminderte Proteinmenge von p53γ auf (Abbildung 10), sodass ich die Expressionslevel mittels Titrationsversuch anpasste (Abbildung 11). Im Western Blot zeigten sich nach der Titration angenäherte wenn auch nicht ganz identische Proteinmengen, was an der angegebenen Fold Change zu sehen ist. Hier wäre eine noch exaktere Titration sinnvoll. Möglicherweise führt die gesteigerte bzw. verminderte Proteinmenge zu einem veränderten Ablauf des DNA-Fiber-Spreading-Assays. Klusmann et al. 2016 [63] zeigten eine Verlängerung der DNA-Tracks durch p53 nach Behandlung mit Nutlin-3, welches zu einer starken p53-Proteinexpression führt. Daher kann man darüber nachdenken, ob das Proteinexpressionslevel von p53 ausschlaggebend für sein Verhalten an der Replikationsgabel ist. Dass die Funktionalität eines Proteins an ein enges Konzentrationsfenster gekoppelt sein kann, zeigt uns auch das HR-Schlüsselprotein RAD51. So fanden sich im Rahmen der Tumorforschung vielzählige Beispiele für ein gesteigertes wie auch vermindertes RAD51-Proteinlevel [5, 14, 93].

Nach der Titration und Angleichung der zellulären Proteinmenge zeigt sich im DNA-Fiber-Spreading-Assay ein ähnliches Muster. Die Expression von p53wt und den beiden Isoformen p53β und p53γ führt zu verkürzten DNA-Tracks, für p53β ist jedoch nur eine partielle Verkürzung nachweisbar. In Bezug auf den Bypassmechanismus heißt dies, dass möglicherweise neben p53wt auch die zwei Isoformen einen Leerlauf bei der Nukleotidpolymerisation zum Überwinden von Replikationshindernissen generieren können, wenngleich p53β einen Teilverlust zeigt. Das wäre für p53γ überraschend, da die vorherigen Versuche gezeigt haben, dass beide Isoformen bei der Rekombinationsstimulation und Interaktion mit PCNA und POLι, was entscheidende Bestandteile des Bypasses sind, ihre Funktion im Vergleich zu p53wt teilweise eingebüßt haben. Das hieße, dass der C-Terminus des p53-Proteins beim Polymerisationsleerlauf keine Rolle spielt oder der neue C-Terminus von p53γ eine kompensatorische Funktion ausüben kann. Eine alternative Möglichkeit wäre, dass neben dem POLι- und Exonuklease-abhängigen Leerlauf noch eine weitere Ursache für die DNA-Verkürzung im Falle der p53γ-Expression existiert. Weiter gedacht hieße dies, dass die Isoformen möglicherweise mit einer anderen Polymerase als POLι interagieren, um den Leerlauf zu ermöglichen, da sich hier nur eine schwache Assoziation nachweisen ließ. Mögliche Kandidaten wären die Transläsionspolymerase κ und ζ. In ihrer Doktorarbeit zeigte Kerstin Büchle, dass durch das Ausschalten der beiden Transläsions-Polymerasen die zuvor untersuchte Rekombinationsfrequenz ebenfalls abnimmt [22] und sie somit einen gewissen Einfluss haben. Sollten andere Polymerasen an der DNA-Track-Verkürzung beteiligt sein, müssten diese mit dem N-Terminus oder der DBD der p53-Isoformen interagieren.

Anhand der Daten wäre es auch denkbar, dass es erst gar nicht zur funktionalen Komplexbildung der Bypass-Cofaktoren und damit zum Stabilisieren und Fortschreiten der Replikationsgabel durch HLTF und ZRANB3 kommt. Somit wäre der Weg frei für andere Akteure wie dem Protein SMARCAL1, das ebenfalls dafür bekannt ist, abgebrochene Replikationsgabeln neu zu starten [10, 13].

Ein alternativer Gedanke ist, dass die verkürzten DNA-Tracks durch einen kontinuierlich verlangsamten Nukleotideinbau oder einen Abbruch der DNA-Synthese entstehen und nicht durch den zuvor beschriebenen Leerlauf. Zum Ausschluss dieser Ursachen sind weitere Untersuchungen notwendig. Stephanie Biber konnte bei ihren Versuchen den

Abbruch der Replikationsgabel als Ursache bereits ausschließen, wodurch sie auch bei den Isoformen als eher unwahrscheinlich gilt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die Expression von p53wt wie auch seiner Isoformen p53β partiell und p53γ vollständig zu einer Verkürzung im DNA-Fiber-Spreading-Assay führen. Da dies bei p53γ höchstwahrscheinlich nicht durch einen POLι-abhängigen Leerlauf entsteht, muss die Verkürzung der DNA-Tracks eine andere Ursache haben. Mögliche Erklärungen wären die Interaktion mit einer anderen Polymerase oder ein Neustart der Replikationsgabel durch bisher unbekannte Akteure wie SMARCAL1, was zu untersuchen bleibt.

4.5 Die Isoformen p53β und p53γ und die Tumorgenese – Ein Ausblick

Bei Untersuchungen zur Tumorgenese zeigte sich, dass nicht p53wt allein, sondern auch das Mitwirken seiner Isoformen von großer Bedeutung ist. Die p53-Isoformen können sowohl die p53wt-Genexpression, wie auch seine Aktivität als Tumorsuppressor beeinflussen. Daher geht man davon aus, dass sowohl die Überexpression der p53-Isoformen als auch ihr Funktionsverlust bei der Tumorgenese, beim Tumorprogress und auch bei der Therapiesensibilität eine Rolle spielt [92].

Fujita et al. 2009 [35] beschrieben, dass es durch eine verminderte Expression von p53β und eine Überexpression von Δ133p53α zum Progress des kolorektalen Adenoms zum Karzinom kommen kann. Die Überexpression von p53β steht im Zusammenhang mit dem Tumorstadium des Nierenzellkarzinoms [89]. Sie wird aber auch für das muzinöse Ovarialkarzinom beschrieben [46]. Eine p53γ-Überexpression verkürzt laut Bischof et al. 2018 [16] das progressionsfreie Überleben von Patientinnen, die am serösen Endometriumkarzinom erkrankt sind. Dass die Isoformexpression auch eine protektive Auswirkung haben kann, sehen wir bei Brustkrebspatientinnen mit mutiertem p53 und Nachweis von p53γ. Hier zeigt sich eine Rückfall- und eine Gesamtüberlebensrate, die vergleichbar mit p53wt-Patientinnen ist. Ist p53γ nicht nachweisbar, so führt dies zu einer insgesamt schlechteren Prognose [59].

Stefanie Biber diskutiert in ihrer Doktorarbeit [41], ob der entdeckte Bypass von Replikationsblockaden Tumorzellen das Überwinden von replikativem Stress durch Chemotherapeutika ermöglicht. So besäße die Zelle eine erhöhte Resistenz beispielsweise

gegenüber PARP-Inhibitoren, welche im Zusammenhang mit der p53-abhängigen HR-Stimulation gesehen wird [49]. Da weder p53β noch p53γ die HR-Stimulation von p53wt reproduzieren können, scheinen sie primär keinen alleinigen Einfluss auf die PARP-Inhibition zu haben. Interessant wäre jedoch die Frage, ob die Isoformen indirekt über p53wt die HR-Stimulation beeinflussen können.

Im DNA-Fiber-Spreading Assay haben wir gehen, dass vor allem p53γ, aber auch p53β in abgeschwächter Weise zu verkürzten DNA-Tracks führt. Resultiert die DNA-Track-Verkürzung aus einem Bypass von Replikationsblockaden, würde dies auf einen Schutzmechanismus von p53β und p53γ hinweisen. Hierfür muss jedoch erst der Mechanismus, der zur Verkürzung der DNA-Tracks führt, weiter untersucht werden.

4.6 Schlussfolgerung

Dass das primär als Tumorsuppressor bekannt gewordene Protein p53 neben der Transkription auch einen direkten Einfluss auf die Genomstabilität nehmen kann, ist eine mittlerweile anerkannte Tatsache. Wie diese Einflussnahme jedoch im Detail aussieht, ist bisher noch weitestgehend unverstanden. In Bezug auf den durch p53 vermittelten rekombinations-assoziierten Bypass von Replikationsblockaden konnten wir jedoch einen kleinen Fortschritt verbuchen. Bei der p53-abhängigen Rekombinationsstimulation sowie bei der Interaktion mit dem Bypass-Hauptakteur POLι ist p53 mit einem vollständigen C-Terminus von Nöten. Auch die Interaktion mit PCNA ist nicht für alle Isoformen reproduzierbar. Dass insbesondere die Isoform p53γ auch ohne den für die Tetramerisierung und damit für die DNA- und Protein-Interaktion wichtigen C-Terminus eine Wirkung an der Replikationsgabel erzielt, sehen wir im DNA-Fiber-Spreading-Assay. Somit haben die Isoformen durchaus die Fähigkeit zelluläre Abläufe mit Hilfe des N-Terminus und der DBD zu beeinflussen, wie z.B. auch schon von Fischbach et al. 2016 [32] für die kovalente und nicht-kovalente PARYlierung gezeigt wurde. Was sich im Detail jedoch nicht unterscheiden lässt, ist, ob die unterschiedlichen Reaktionsergebnisse von p53β und p53γ im Vergleich zu p53wt auf das Fehlen der OD oder der CTD zurückzuführen sind. Hierfür müssen weitere Versuche mit Proteinen durchgeführt werden, bei denen jeweils nur eine Domäne ausgeschaltet ist. Darüber hinaus haben wir gesehen, dass die Proteinexpressionen trotz gleicher Plasmidkonzentrationen variieren. Aufgrund dessen wurde im Verlauf eine Anpassung vorgenommen. Es bleibt aber offen, in wie weit die zuvor

durchgeführten Versuche durch die Abweichung der Proteinexpressionen beeinflusst wurden. Wir sehen bei p53γ im Vergleich zu p53β sowohl eine angedeutet schwächere Stimulation bei der Rekombinationsfrequenz wie auch eine signifikant schwächere Interaktion im PLA (p53pSer15/PCNA) und mehr noch im PLA (p53pSer15/POLι). Es wäre also gut denkbar, dass sich mit angepassten Proteinmengen von p53β und p53γ die Ergebnisse der Rekombinationsanalyse und der PLAs annähern, was zu überprüfen bleibt.

5 Zusammenfassung

Das Ziel meiner Doktorarbeit war es, den neu entdeckten Bypass von Replikationsblockaden durch p53 auf seine Funktionalität durch die p53-Isoformen p53β und p53γ näher zu untersuchen und hierbei insbesondere einen Blick auf die Interaktion mit den Bypass-Cofaktoren zu werfen. Dadurch versprach ich mir neue Details über die bei der Interaktion von p53 beteiligten Komponenten und über das Mitwirken der Isoformen an geblockten Replikationsgabeln. Die verwendeten p53-Isoformen besitzen aufgrund von alternativem Splicen anstatt der Oligomerisierungsdomäne (OD) und der C-Terminus-Regulationsdomäne (CTD) 10 bzw. 15 zusätzliche Aminosäuren.

Im Labor meiner Dissertationsbetreuerin Prof. Dr. Lisa Wiesmüller wurde erstmals gezeigt, dass p53 neben einem inhibitorischen auch einen stimulierenden Einfluss auf die homologe Rekombination (HR) ausüben kann. Diese Erkenntnis öffnete die Tür für weitere Forschungsarbeiten, im Rahmen derer ein neuer Bypass zur Überwindung von endogenen und exogenen Replikationsblockaden entdeckt wurde. Hierzu generiert die Zelle mit Hilfe der Polymerase ι (POLι) und der Exonukleasefunktion vom p53-Wildtyp (p53wt) einen Polymerisationsleerlauf. So gewinnt die Zelle Zeit, um mit Hilfe des Helikase-like-Transkriptionsfaktors (HLTF), dem Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) und der Endonuklease und Translokase ZRANB3 die Replikationsgabel zu stabilisieren und neu zu starten. So wird p53 neuerdings eine Healer-Funktion zur Genomstabilisierung zugeschrieben, welche jedoch auch mit einer erhöhten Resistenz in der Tumortherapie wie bei den Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Inhibitoren (PARP-Inhibitoren) einhergeht.

Als wichtiger Bestandteil des Bypasses stellte sich neben der Rekombinationsstimulation die mittels Proximity Ligation Assay (PLA) aufgezeigte Interaktion von PCNA und POLι mit p53pSer15 heraus, welche im Zusammenhang mit geblockten Replikationsgabeln steht. Darüber hinaus ließ sich der Leerlauf der Nukleotidpolymerisation durch verkürzte DNA-Tracks im DNA-Fiber-Spreading-Assay quantifizieren. Anhand dieser Versuche untersuchte ich in meiner Doktorarbeit das Verhalten der p53-Isoformen p53β und p53γ.

Bei der Analyse der Rekombinationsfrequenz von K562-Zellen mit integriertem Rekombinationssubstrat (HR-*EGFP*/3'*EGFP*) zeigte sich, dass weder p53β noch p53γ die Rekombination, wie wir es zuvor bei p53wt gesehen haben, stimuliert. Im PLA (p53pSer15/PCNA) fand sich zunächst nur bei p53β eine zu p53wt annähernd gleichwertige

Protein-Protein-Assoziation. Nach der zusätzlichen Behandlung mit dem DNA-Crosslinker Mitomycin C (MMC) zeigten beiden Isoformen eine annähernd gleiche, aber im Vergleich zu p53wt reduzierte Assoziation. Wie sich die Assoziation von den Isoformen mit POLι verändert, testete ich ebenfalls mittels PLA(p53pSer15/POLι). Offensichtlich war durch die Expression von p53β die Protein-Assoziation bereits stark reduziert. Bei p53γ ließ sich keine Interaktion mit POLι mehr nachweisen.

Daher schlussfolgerte ich, dass sowohl für die Steigerung der Rekombinationsfrequenz wie auch für die Interaktion mit den Bypass-Cofaktoren PCNA und POLι ein vollständiger C-Terminus benötigt wird. Genauer gesagt geht besonders durch den Verlust der OD, die für die Tetramerisierung und damit für DNA- und Protein-Bindung elementar ist, aber auch durch den Verlust der CTD ein Teil der p53wt-Funktion verloren. Das unterschiedliche Reaktionsverhalten der Isoformen wird möglicherweise auch durch ein sehr unterschiedliches Expressionsniveau beeinflusst. Besonders die geringe Konzentration von p53γ, aufgrund dessen für die Isoformen eine zytotoxische Eigenschaft diskutiert wird, gilt es zu beachten.

Im DNA-Fiber-Spreading-Assay zeigte sich interessanterweise, dass nicht alle Abläufe im Bypass von Replikationsblockaden an p53wt mit intaktem C-Terminus geknüpft sind. Vor allem die Expression von p53γ führte zu einer DNA-Track-Verkürzung vergleichbar mit der von p53wt. Die Entstehung von verkürzten DNA-Tracks wurde bisher mit einer temporär unterbrochenen Replikation zur Initiierung des Bypasses erklärt. Da die Isoformen jedoch aufgrund ihrer C-Terminus-Variation nur noch fraglich mit PCNA und POLι interagieren, scheint hier noch ein anderer Mechanismus bei der DNA-Track-Verkürzung zu agieren. Ein möglicher Aspekt wäre die Interaktion von p53β und p53γ mit anderen Polymerasen wie den Polymerasen ζ und κ, was zu überprüfen bleibt.

Insgesamt betrachtet ist p53 das Schlüsselprotein der Zellregulation und es beschützt gemeinsamen mit seinen Isoformen die Integrität der Erbinformation. Dieses komplexe Gebilde macht die zelluläre Reaktion auf Mutationen im Rahmen der Tumorgenese, sowie auf die Therapie und das daran geknüpfte Outcome so schwer vorhersehbar. Mit dieser Arbeit habe ich einen kleinen Beitrag zur Entschlüsselung beigetragen.

6 Literaturverzeichnis

1. Ahn J, Poyurovsky M V, Baptiste N, Beckerman R, Cain C, Mattia M, McKinney K, Zhou J, Zupnick A, Gottifredi V, Prives C: Dissection of the sequence-specific DNA binding and exonuclease activities reveals a superactive yet apoptotically impaired mutant p53 protein. Cell Cycle 8: S. 1603–15 (2009)

2. Ahn J, Prives C: The C-terminus of p53: The more you learn the less you know. , *Nature Structural Biology*, 8: . Nature Publishing Group, S. 730–732 (2001)

3. Akyuz N, Boehden G S, Susse S, Rimek A, Preuss U, Scheidtmann K-H, Wiesmuller L: DNA Substrate Dependence of p53-Mediated Regulation of Double-Strand Break Repair. Mol Cell Biol 22: S. 6306–6317 (2002)

4. Albrechtsen N, Dornreiter I, Grosse F, Ella K, Wiesmüller L, Deppert W: Maintenance of genomic integrity by p53: Complementary roles for activated and non-activated p53. Oncogene 18: S. 7706–7717 (1999)

5. Arias-Lopez C, Lazaro-Trueba I, Kerr P, Lord C J, Dexter T, Iravani M, Ashworth A, Silva A: p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. EMBO Rep 7: S. 219–224 (2006)

6. Avery-Kiejda K A, Zhang X D, Adams L J, Scott R J, Vojtesek B, Lane D, Hersey P: Small Molecular Weight Variants of p53 Are Expressed in Human Melanoma Cells and Are Induced by the DNA-Damaging Agent Cisplatin. Clin Cancer Res 14: S. 1659–1668 (2008)

7. Bakhanashvili M: Exonucleolytic proofreading by p53 protein. Eur J Biochem 268: S. 2047–2054 (2001)

8. Balagurumoorthy P, Sakamoto H, Lewis M S, Zambrano N, Clore G M, Gronenborn A M, Appella E, Harrington R E: Four p53 DNA-binding domain peptides bind natural p53-response elements and bend the DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 92: S. 8591–8595 (1995)

9. Banks D, Wu M, Higa L A, Gavrilova N, Quan J, Ye T, Kobayashi R, Sun H, Zhang H: L2DTL/CDT2 and PCNA interact with p53 and regulate p53 polyubiquitination and protein stability through MDM2 and CUL4A/DDB1 complexes. Cell Cycle 5: S. 1719–1729 (2006)

10. Bansbach C E, Bétous R, Lovejoy C A, Glick G G, Cortez D: The annealing helicase SMARCAL1 maintains genome integrity at stalled replication forks. Genes Dev 23: S. 2405–2414 (2009)

11. Bertrand P, Rouillard D, Boulet A, Levalois C, Soussi T, Lopez B S: Increase of spontaneous intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells expressing a mutant p53 protein. Oncogene 1997 149 14: S. 1117 (1997)

12. Bertrand P, Saintigny Y, Lopez B S: p53's double life: Transactivation-independent repression of homologous recombination. , *Trends in Genetics*, 20: . S. 235–243 (2004)

13. Bétous R, Mason A C, Rambo R P, Bansbach C E, Badu-Nkansah A, Sirbu B M, Eichman B F, Cortez D: SMARCAL1 catalyzes fork regression and holliday junction migration

to maintain genome stability during DNA replication. Genes Dev 26: S. 151–162 (2012)

14. Bhattacharya S, Srinivasan K, Abdisalaam S, Su F, Raj P, Dozmorov I, Mishra R, Wakeland E K, Ghose S, Mukherjee S, Asaithamby A: RAD51 interconnects between DNA replication, DNA repair and immunity. Nucleic Acids Res 45: S. 4590–4605 (2017)

15. Biber S, Pospiech H, Gottifredi V, Wiesmüller L, Wiesmüller W: Multiple biochemical properties of the p53 molecule contribute to activation of polymerase iota-dependent DNA damage tolerance. Nucleic Acids Res 48: S. 12188–12203 (2020)

16. Bischof K, Knappskog S, Stefansson I, McCormack E M, Trovik J, Werner H M J, Woie K, Gjertsen B T, Bjorge L: High expression of the p53 isoform γ is associated with reduced progression-free survival in uterine serous carcinoma. BMC Cancer 18: S. 684 (2018)

17. Blastyak A, Hajdu I, Unk I, Haracska L: Role of Double-Stranded DNA Translocase Activity of Human HLTF in Replication of Damaged DNA. Mol Cell Biol 30: S. 684–693 (2010)

18. Boehden G S, Baumann C, Siehler S, Wiesmüller L: Wild-type p53 stimulates homologous recombination upon sequence-specific binding to the ribosomal gene cluster repeat. Oncogene 24: S. 4183–4192 (2005)

19. Boehden G S, Restle A, Marschalek R, Stocking C, Wiesmüller L: Recombination at chromosomal sequences involved in leukaemogenic rearrangements is differentially regulated by p53. Carcinogenesis 25: S. 1305–1313 (2004)

20. Boldrup L, Bourdon J-C, Coates P J, Sjöström B, Nylander K: Expression of p53 isoforms in squamous cell carcinoma of the head and neck. Eur J Cancer 43: S. 617–623 (2007)

21. Bourdon J-C, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas D P, Saville M K, Lane D P: p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. Genes Dev 19: S. 2122–37 (2005)

22. Büchle K E: Bedeutung der Tumorsuppressors p53 für die Regulation der DNA-Reparatur via homologe Rekombination und Transläsionssynthese. , Universität Ulm (2015)

23. Chène P: The role of tetramerization in p53 function. Oncogene 20: S. 2611–2617 (2001)

24. Chi S W, Lee S H, Kim D H, Ahn M J, Kim J S, Woo J Y, Torizawa T, Kainosho M, Han K H: Structural details on mdm2-p53 interaction. J Biol Chem 280: S. 38795–38802 (2005)

25. Ciccia A, Nimonkar A V, Hu Y, Hajdu I, Achar Y J, Izhar L, Petit S A, Adamson B, Yoon J C, Kowalczykowski S C, Livingston D M, Haracska L, Elledge S J: Polyubiquitinated PCNA Recruits the ZRANB3 Translocase to Maintain Genomic Integrity after Replication Stress. Mol Cell 47: S. 396–409 (2012)

26. D'Abramo M, Bešker N, Desideri A, Levine A J, Melino G, Chillemi G: The p53 tetramer

shows an induced-fit interaction of the C-terminal domain with the DNA-binding domain. Oncogene 35: S. 3272–81 (2016)

27. DeLeo A B, Jay G, Appella E, Dubois G C, Law L W, Old L J: Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 76: S. 2420–2424 (1979)

28. Dudenho¨ffer C, Dudenho¨ffer D, Rohaly G, Will K, Deppert W, Wiesmu¨ller L, Wiesmu¨ller W: Specific Mismatch Recognition in Heteroduplex Intermediates by p53 Suggests a Role in Fidelity Control of Homologous Recombination. (1998)

29. Dudenhöffer C, Kurth M, Janus F, Deppert W, Wiesmüller L: Dissociation of the recombination control and the sequence-specific transactivation function of P53. Oncogene 18: S. 5773–5784 (1999)

30. Dudenhöffer C, Kurth M, Janus F, Deppert W, Wiesmüller L: Dissociation of the recombination control and the sequence-specific transactivation function of P53. Oncogene 18: S. 5773–5784 (1999)

31. Federley R G, Romano L J: DNA polymerase: structural homology, conformational dynamics, and the effects of carcinogenic DNA adducts. J Nucleic Acids 2010: (2010)

32. Fischbach A, Krüger A, Krüger K, Hampp S, Assmann G, Rank L, Hufnagel M, Stöckl M T, Stöckl S, Fischer J M F, Veith S, Rossatti P, Ganz M, Ferrando-May E, Hartwig A, Hauser K, Wiesmüller L, Wiesmüller W, Urkle A B ¨, Mangerich A: The C-terminal domain of p53 orchestrates the interplay between non-covalent and covalent poly(ADP-ribosyl)ation of p53 by PARP1. Nucleic Acids Res 46: S. 804–822 (2018)

33. Flaman J M, Waridel F, Estreicher A, Vannier A, Limacher J M, Gilbert D, Iggo R, Frebourg T: The human tumour suppressor gene p53 is alternatively spliced in normal cells. Oncogene 12: S. 813–818 (1996)

34. Fox J T, Lee K, Myung K: Dynamic regulation of PCNA ubiquitylation/deubiquitylation. FEBS Lett 585: S. 2780–5 (2011)

35. Fujita K, Mondal A M, Horikawa I, Nguyen G H, Kumamoto K, Sohn J J, Bowman E D, Mathe E A, Schetter A J, Pine S R, Ji H, Vojtesek B, Bourdon J-C, Lane D P, Harris C C: p53 isoforms Delta133p53 and p53beta are endogenous regulators of replicative cellular senescence. Nat Cell Biol 11: S. 1135–42 (2009)

36. Gatz S A, Wiesmüller L: p53 in recombination and repair. , *Cell Death and Differentiation*, 13: . S. 1003–1016 (2006)

37. Ghosh A, Stewart D, Matlashewski G: Regulation of Human p53 Activity and Cell Localization by Alternative Splicing. Mol Cell Biol 24: S. 7987–7997 (2004)

38. Gong L, Gong H, Pan X, Chang C, Ou Z, Ye S, Yin L, Yang L, Tao T, Zhang Z, Liu C, Lane D P, Peng J, Chen J: p53 isoform Δ113p53/Δ133p53 promotes DNA double-strand break repair to protect cell from death and senescence in response to DNA damage. Cell Res 25: S. 351–69 (2015)

39. Graupner V, Schulze-Osthoff K, Essmann F, Jänicke R U: Functional characterization of p53β and p53γ, two isoforms of the tumor suppressor p53. Cell Cycle 8: S. 1238–1248 (2009)

40. Gudkov A V.: Converting p53 from a killer into a healer. , *Nature Medicine*, 8: . Nature Publishing Group, S. 1196–1198 (2002)

41. Hampp S: Regulatory Role of p53 in the Reactivation of Stalled Replication Forks. , Department of Obstetrics and Gynecology, Ulm University (2017)

42. Hampp S, Kiessling T, Buechle K, Mansilla S F, Thomale J, Rall M, Ahn J, Pospiech H, Gottifredi V, Wiesmüller L: DNA damage tolerance pathway involving DNA polymerase ι and the tumor suppressor p53 regulates DNA replication fork progression. Proc Natl Acad Sci U S A 113: S. E4311-9 (2016)

43. Hanahan D: Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol 166: S. 557–580 (1983)

44. Harris S L, Levine A J: The p53 pathway: positive and negative feedback loops. Oncogene 24: S. 2899–2908 (2005)

45. He F, Borcherds W, Song T, Wei X, Das M, Chen L, Daughdrill G W, Chen J: Interaction between p53 N terminus and core domain regulates specific and nonspecific DNA binding. Proc Natl Acad Sci U S A 116: S. 8859–8868 (2019)

46. Hofstetter G, Berger A, Berger R, Zorić A, Braicu E I, Reimer D, Fiegl H, Marth C, Zeimet A G, Ulmer H, Moll U, Zeillinger R, Concin N: The N-terminally truncated p53 isoform Δ40p53 influences prognosis in mucinous ovarian cancer. Int J Gynecol Cancer 22: S. 372–379 (2012)

47. Hofstetter G, Berger A, Fiegl H, Slade N, Zorić A, Holzer B, Schuster E, Möbus V J, Reimer D, Daxenbichler G, Marth C, Zeimet A G, Concin N, Zeillinger R: Alternative splicing of p53 and p73: the novel p53 splice variant p53δ is an independent prognostic marker in ovarian cancer. Oncogene 29: S. 1997–2004 (2010)

48. Huang T, Long M, Huo B: Competitive Binding to Cuprous Ions of Protein and BCA in the Bicinchoninic Acid Protein Assay. Open Biomed Eng J 4: S. 271–8 (2010)

49. Ireno I C, Wiehe R S, Stahl A I, Hampp S, Aydin S, Troester M A, Selivanova G, Wiesmüller L: Modulation of the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor response and DNA recombination in breast cancer cells by drugs affecting endogenous wild-type p53. Carcinogenesis 35: S. 2273–2282 (2014)

50. Jenkins J R, Rudge K, Chumakov P, Currie G A: The cellular oncogene p53 can be activated by mutagenesis. Nature 317: S. 816–818 (1985)

51. Joerger A C, Fersht A R: Structural biology of the tumor suppressor p53. Annu Rev Biochem 77: S. 557–582 (2008)

52. Joruiz S M, Bourdon J-C: p53 Isoforms: Key Regulators of the Cell Fate Decision. Cold Spring Harb Perspect Med 6: (2016)

53. Kannouche P L, Lehmann A R: Ubiquitination of PCNA and the polymerase switch in human cells. Cell Cycle 3: S. 1011–3 (2004)

54. Kannouche P L, Wing J, Lehmann A R: Interaction of human DNA polymerase η with monoubiquitinated PCNA: A possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. Mol Cell 14: S. 491–500 (2004)

55. Kaustov L, Yi G S, Ayed A, Bochkareva E, Bochkarev A, Arrowsmith C H: p53 transcriptional activation domain: A molecular chameleon?. Cell Cycle 5: S. 489–494 (2006)

56. Kelman Z: PCNA: structure, functions and interactions. Oncogene 14: S. 629-640. (1997)

57. Kern S, Kinzler K, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B: Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. Science (80-) 252: S. 1708–1711 (1991)

58. Khare V, Eckert K A: The proofreading 3′ → 5′ exonuclease activity of DNA polymerases: A kinetic barrier to translesion DNA synthesis. , *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 510: . Elsevier, S. 45–54 (2002)

59. Khoury M P, Bourdon J-C: p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor?. Genes Cancer 2: S. 453–465 (2011)

60. Khoury M P, Bourdon J-C: The isoforms of the p53 protein. Cold Spring Harb Perspect Biol 2: S. a000927 (2010)

61. Kießling T: Role of p53 and its exonuclease activity in DNA recombination and its interactions with DNA replication proteins. , Department of Obstetrics and Gynecology, Ulm University (2014)

62. Kim S, Balakrishnan S K, Gross D S: p53 Interacts with RNA polymerase II through its core domain and impairs Pol II processivity in vivo. PLoS One 6: S. e22183 (2011)

63. Klusmann I, Rodewald S, Li Y, Schulz-Heddergott R, Dobbelstein M: p53 Activity Results in DNA Replication Fork Processivity. Cell Rep 17: (2016)

64. Klusmann I, Wohlberedt K, Magerhans A, Teloni F, Korbel J O, Altmeyer M, Dobbelstein M: Chromatin modifiers Mdm2 and RNF2 prevent RNA:DNA hybrids that impair DNA replication. Proc Natl Acad Sci U S A 115: S. E11311–E11320 (2018)

65. Kühn C, Müller F, Melle C, Nasheuer H-P, Janus F, Deppert W, Grosse F: Surface plasmon resonance measurements reveal stable complex formation between p53 and DNA polymerase α. Oncogene 18: S. 769–774 (1999)

66. Kussie P H, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine A J, Pavletich N P: Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. Science (80-) 274: S. 948–953 (1996)

67. Lane D P, Crawford L V.: T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells [19]. , *Nature*, 278: . Nature Publishing Group, S. 261–263 (1979)

68. Lane D: The Guardian of the Genome: p53. Nature 358: S. 15–16 (1992)

69. Laptenko O, Shiff I, Freed-Pastor W, Zupnick A, Mattia M, Freulich E, Shamir I, Kadouri N, Kahan T, Manfredi J, Simon I, Prives C: The p53 C Terminus Controls Site-Specific DNA Binding and Promotes Structural Changes within the Central DNA Binding Domain. Mol Cell 57: S. 1034–1046 (2015)

70. Lee S, Cavallo L, Griffith J: Human p53 Binds Holliday Junctions Strongly and

Facilitates Their Cleavage. J Biol Chem 272: S. 7532–7539 (1997)

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

72. Linzer D I H, Levine A J: Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. Cell 17: S. 43–52 (1979)

73. Makarova A V., Kulbachinskiy A V.: Structure of human DNA polymerase iota and the mechanism of DNA synthesis. Biochem 77: S. 547–561 (2012)

74. Marcel V, Perrier S, Aoubala M, Ageorges S, Groves M J, Diot A, Fernandes K, Tauro S, Bourdon J-C: Δ160p53 is a novel N-terminal p53 isoform encoded by Δ133p53 transcript. FEBS Lett 584: S. 4463–4468 (2010)

75. Marcel V, Tran P L T, Sagne C, Martel-Planche G, Vaslin L, Teulade-Fichou M-P, Hall J, Mergny J-L, Hainaut P, Van Dyck E: G-quadruplex structures in TP53 intron 3: role in alternative splicing and in production of p53 mRNA isoforms. Carcinogenesis 32: S. 271–278 (2011)

76. May P, May E: Twenty years of p53 research: Structural and functional aspects of the p53 protein. , *Oncogene*, 18: . Nature Publishing Group, S. 7621–7636 (1999)

77. Mekeel K L, Tang W, Kachnic L A, Luo C-M, DeFrank J S, Powell S N: Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. Oncogene 14: S. 1847–1857 (1997)

78. Mowat M, Cheng A, Kimura N, Bernstein A, Benchimol S: Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by Friend virus. Nature 314: S. 633–636 (1985)

79. Mummenbrauer T, Janus F, Müller B, Wiesmüller L, Deppert W, Grosse F: p53 protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. , *Cell*. (1996)

80. Poyurovsky M V, Katz C, Laptenko O, Beckerman R, Lokshin M, Ahn J, Byeon I-J L, Gabizon R, Mattia M, Zupnick A, Brown L M, Friedler A, Prives C: The C terminus of p53 binds the N-terminal domain of MDM2. Nat Struct Mol Biol 17: S. 982–989 (2010)

81. Restle A, Färber M, Baumann C, Böhringer M, Scheidtmann K H, Müller-Tidow C, Wiesmüller L: Dissecting the role of p53 phosphorylation in homologous recombination provides new clues for gain-of-function mutants. Nucleic Acids Res 36: S. 5362–75 (2008)

82. Restle A, Janz C, Wiesmüller L: Differences in the association of p53 phosphorylated on serine 15 and key enzymes of homologous recombination. Oncogene 24: S. 4380–4387 (2005)

83. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A: Transcriptional control of human p53-regulated genes. Nat Rev Mol Cell Biol 9: S. 402–412 (2008)

84. Roemer K: Mutant p53: Gain-of-Function Oncoproteins and Wild-Type p53 Inactivators. Biol Chem 380: S. 879–887 (1999)

85. Romanova L Y, Willers H, Blagosklonny M V., Powell S N: The interaction of p53 with replication protein A mediates suppression of homologous recombination. Oncogene 23: S. 9025–9033 (2004)

86. Sengupta S, Harris C C: p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. Nat Rev Mol Cell Biol 6: S. 44–55 (2005)

87. Sengupta S, Linke S P, Pedeux R, Yang Q, Farnsworth J, Garfield S H, Valerie K, Shay J W, Ellis N A, Wasylyk B, Harris C C: BLM helicase-dependent transport of p53 to sites of stalled DNA replication forks modulates homologous recombination. EMBO J 22: S. 1210–1222 (2003)

88. Seo Y R, Kelley M R, Smith M L: Selenomethionine regulation of p53 by a ref1-dependent redox mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A 99: S. 14548–53 (2002)

89. Song W, Huo S W, Lü J J, Liu Z, Fang X L, Jin X B, Yuan M Z: Expression of p53 isoforms in renal cell carcinoma. Chin Med J (Engl) 122: S. 921–926 (2009)

90. Srivastava M, Raghavan S C: DNA Double-Strand Break Repair Inhibitors as Cancer Therapeutics. Chem Biol 22: S. 17–29 (2015)

91. Stommel J M: A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. EMBO J 18: S. 1660–1672 (1999)

92. Surget S, Khoury M P, Bourdon J C: Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: A clinical perspective. , *OncoTargets and Therapy*, 7: . Dove Press, S. 57–67 (2013)

93. Thacker J: The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. , *Cancer Letters*, 219: . Elsevier Ireland Ltd, S. 125–135 (2005)

94. Vieler M, Sanyal S: P53 isoforms and their implications in cancer. , *Cancers*, 10: . Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) (2018)

95. Vogelstein B, Lane D, Levine A J: Surfing the p53 network. Nature 408: S. 307–310 (2000)

96. Walker K K, Levine A J: Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. Proc Natl Acad Sci U S A 93: S. 15335–40 (1996)

97. Wiesmüller L, Cammenga J, Deppert W W: In vivo assay of p53 function in homologous recombination between simian virus 40 chromosomes. J Virol 70: S. 737–44 (1996)

98. Willers H, McCarthy E E, Wu B, Wunsch H, Tang W, Taghian D G, Xia F, Powell S N: Dissociation of p53-mediated suppression of homologous recombination from G1/S cell cycle checkpoint control. Oncogene 19: S. 632–639 (2000)

99. Zhou J, Ahn J, Wilson S H, Prives C: A role for p53 in base excision repair. EMBO J 20: S. 914–23 (2001)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei allen bedanken, die mich bei meiner Dissertation unterstützt haben.

Ein besonderer Dank geht an meine Doktormutter Frau Prof. Dr. Lisa Wiesmüller für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die spannenden Einblicke in ihre Forschungsarbeit, für die gute Betreuung und Unterstützung mit ihrem bewundernswerten Wissen. Einen besonderen Dank auch für die kritische Auseinandersetzung und die hilfreichen Hinweise bei der schriftlichen Ausarbeitung meiner Dissertation.

Ein sehr großer Dank geht auch an Stephanie Biber, die mich auf dem gesamten Weg mit großer Motivation, vielen hilfreichen Tipps, dem Beantworten zahlreicher Fragen und viel Geduld begleitet hat. Ohne dich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen! Danke!

Mein Dank richtet sich auch an das ganze Labor-Team. Ihr habt mich jederzeit mit Rat und Tat unterstützt und den einen oder anderen Knoten im Kopf bei gemeinsamen Pausen gelöst.

Mein größter Dank geht an meine Familie, die immer hinter mir steht. Im Laufe meiner gesamten Studienzeit und auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit habt ihr mich unterstützt, motiviert und immer die richtigen Worte gefunden.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Katharina und Jana, Danke für sieben unvergessliche Jahre!

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.