

Aus dem Institut für Experimentelle Tumorforschung
(Direktorin: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel,
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

TRAIL-Todesrezeptoren als Regulatoren des Tumorsuppressors p53

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Michelle Jeannine Poelker
aus Lübeck

Kiel, 2022

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Anna Trauzold
2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Wolfram Klapper

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 17.01.2023

gez.: Prof. Dr. Anna Trauzold

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. EINLEITUNG	1
1.1 DAS TUMORSUPPRESSORPROTEIN P53 – FUNKTIONEN, BEDEUTUNG IN DER TUMORENTSTEHUNG UND -BEHANDLUNG	1
1.2 TRAIL UND SEINE REZEPTOREN	7
1.3 DER TRAIL-INDUZIERTER APOPTOTISCHER SIGNALWEG	8
1.4 TRAIL-INDUZIERTER NICHT-APOPTOTISCHER SIGNALWEG	9
1.5 FUNKTIONEN DES NUKLEÄREN TRAIL-R2	10
1.6 MIKRO-RNAs UND DEREN BIOGENESE	11
1.7 MICRO-RNAs UND EPIDERMAL-MESENCHYMAL TRANSITION	13
1.8 DIE BEDEUTUNG VON TRAIL UND TRAIL-R FÜR DIE ANTITUMORALE THERAPIE	16
1.9 FRAGESTELLUNG UND ZIEL DIESER ARBEIT	17
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 MATERIAL	18
2.1.1 Zelllinien	18
2.1.2 Lösungen und Puffer	18
2.1.3 Kits	20
2.1.4 siRNA	20
2.1.5 Plasmide	21
2.1.6 Antikörper	21
2.1.7 Chemikalien	23
2.1.8 Geräte	25
2.1.9 Verbrauchsmaterialien	26
2.2 METHODEN	28
2.2.1 Langzeitlagerung der Zellen	28
2.2.2 Zellkultur	28
2.2.3 Zellzählung	29
2.2.4 Herstellung von Ganzzelllysaten mit RIPA-Puffer	29
2.2.5 Herstellung von Ganzzelllysaten mit IP-Lysepuffer	30
2.2.6 Herstellung von Kernlysaten mit EMSA-Puffer	30
2.2.7 Proteinbestimmungen mittels BCA-Assay	31

2.2.8	<i>Proteinbestimmung mittels DC-Assay (nach Lowry)</i>	31
2.2.9	<i>P53 DNA binding ELISA</i>	31
2.2.10	<i>siRNA-Transfektion</i>	32
2.2.11	<i>Plasmid-Transfektion und Dual-Luziferase-Assay</i>	32
2.2.12	<i>Immunfluoreszenzfärbung</i>	34
2.2.13	<i>Imaging Flow Cytometry</i>	36
2.2.14	<i>Immunpräzipitation</i>	36
2.2.15	<i>Protein-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)</i>	38
2.2.16	<i>Western-Blot und Immundetektion</i>	39
3.	ERGEBNISSE	41
3.1	ÜBERPRÜFUNG DER INTRAZELLULÄREN VERTEILUNG VON TRAIL-R2 UND P53	41
3.2	ÜBERPRÜFUNG DER INTERAKTION ZWISCHEN TRAIL-R2 UND P53 IM ZELLKERN	46
3.3	EINFLUSS DES TRAIL-REZEPTORSTATUS AUF DIE P53-AKTIVITÄT	48
3.4	EINFLUSS DES TRAIL-R2-STATUS AUF WICHTIGE TARGETPROTEINE DES TUMOR-SUPPRESSORPROTEINS P53	50
3.5	EINFLUSS DES TRAIL-R2-STATUS AUF DIE AKTIVITÄT DES P21-PROMOTORS	52
3.6	EINFLUSS VON TRAIL-R2 AUF DIE P53-VERMITTELTE PROLIFERATIONS- SOWIE EMT-REGULATION	55
4.	DISKUSSION	62
4.1	TRAIL-2 BEEINFLUSST DAS TUMORSUPPRESSORPROTEIN P53	62
4.1.1	<i>TRAIL-R2 und das Tumorsuppressorprotein p53 kolokalisieren im Zellkern</i>	62
4.1.2	<i>Die Hemmung des TRAIL-R2 führt zu einer gesteigerten Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53</i>	66
4.2	DER TRAIL-2-REZEPTOR BEEINFLUSST DAS TUMORSUPPRESSORPROTEIN P53 IN SEINER FUNKTION ALS TRANSKRIPTIONSFAKTOR	67
4.2.1	<i>Der Knockdown des TRAIL-R2 verursacht eine vermehrte Expression der proteinkodierenden Zielgene des Tumorsuppressorproteins p53</i>	67
4.2.2	<i>Die Herunterregulation des TRAIL-R2 führt zu einer p53-abhängigen, TRAIL-unabhängigen Aktivierung des p21-Promotors</i>	70
4.3	DER TRAIL-2-REZEPTORSTATUS BEEINFLUSST DIE P53-ABHÄNGIGE REGULATION VON PROLIFERATION SOWIE EPIDERMALER-MESENCHYMALER TRANSITION	71
4.3.1	<i>Die Hemmung des TRAIL-R2 führt zu einer gesteigerten Expression der miR-200-Familie 72</i>	

4.3.2	<i>Die Hemmung des TRAIL-R2 beeinflusst in WT-p53-Zellen die zentral EMT-regulierenden Proteine E-Cadherin und ZEB1</i>	73
4.3.3	<i>Die Hemmung des TRAIL-R2 führt zu einer p53-abhängigen Steigerung der miR-200c-Promotoraktivität</i>	74
4.4	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	77
5.	ZUSAMMENFASSUNG	80
6.	LITERATURVERZEICHNIS	81
7.	DANKSAGUNG	91
8.	ANHANG – EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG, INFORMATION	92

<u>Abbildung 1: Funktionen von WT p53 in Bezug auf multifaktoriell bedingte Zellschädigung</u>	2
<u>Abbildung 2: Regulation von p53 durch MDM2</u>	3
<u>Abbildung 3: Ausgewählte Eigenschaften von mutiertem p53 und dessen zugrundeliegende Mechanismen</u>	6
<u>Abbildung 4: Übersicht der bekannten, beim Menschen vorkommenden TRAIL-Rezeptoren</u>	8
<u>Abbildung 5: TRAIL-induzierte apoptotische und nicht-apoptotische Signalwege</u>	10
<u>Abbildung 6: Übersicht der Funktionen von nukleärem TRAIL-R2</u>	11
<u>Abbildung 7: Entstehung der Micro-RNAs</u>	13
<u>Abbildung 8: Erläuterung des Ablaufs sowie der Einflussfaktoren von MET und EMT</u>	14
<u>Abbildung 9: Schematische Darstellung der negativen Feedbackschleife zwischen miR200-Familie und ZEB</u>	16
<u>Abbildung 10: Schematische Darstellung eines Luziferase Assays</u>	34
<u>Abbildung 11: Schematischer Aufbau einer Western Blot Kammer</u>	40
<u>Abbildung 12: Untersuchung der intrazellulären Verteilung von TRAIL-R2 und p53 mittels Immunfluoreszenzfärbung</u>	44
<u>Abbildung 13: Untersuchung der intrazellulären Verteilung und einer möglichen Kolokalisation von TRAIL-R1 und p53 sowie eventueller unspezifischer Bindungen der Antikörper</u>	45
<u>Abbildung 14: Überprüfung der Spezifität der anti-p53-Antikörper mittels Immunfluoreszenzfärbung</u>	46
<u>Abbildung 15: Nachweis der nukleären Interaktion zwischen TRAIL-R2 und dem Tumorsuppressorprotein p53 mittels Immunpräzipitation</u>	48
<u>Abbildung 16: Kontrolle des Trail-R1- und R2-Knockdowns</u>	49
<u>Abbildung 17: Untersuchung des Einflusses von TRAIL-R2 auf die Aktivierung von p53</u>	50
<u>Abbildung 18: Analyse der Auswirkung einer TRAIL-R2-Hemmung auf ausgewählte p53-Targetproteine</u>	51
<u>Abbildung 19: Schematische Darstellung der p21-Konstrukte</u>	52
<u>Abbildung 20: Untersuchung des Einflusses der TRAIL-R2-Hemmung auf die Aktivierung des p21-Promotors</u>	53
<u>Abbildung 21: Untersuchung des Einflusses des TRAIL-R2-Knockdowns auf die Aktivierung des p21-Promotors in Abhängigkeit vom p53-Status</u>	54
<u>Abbildung 22: Untersuchung des Einflusses der TRAIL-R2-Hemmung auf die Aktivierung des p21-Promotors in Abhängigkeit vom p53-Status sowie endogenem TRAIL</u>	55
<u>Abbildung 23: Analyse des Effekts der TRAIL-R2-Hemmung auf die Expression ausgewählter miR-200-Familienmitglieder</u>	56
<u>Abbildung 24: Analyse der Auswirkung einer Hemmung des TRAIL-R2 auf die zentralen EMT-Proteine ZEB-1 und E-Cadherin</u>	58
<u>Abbildung 25: Schematische Darstellung der mi-R-200c-Konstrukte</u>	59
<u>Abbildung 26: Analyse des Einflusses von TRAIL-R2 auf die ZEB- und p53-vermittelte Regulation der Aktivität des miR200c-Promotors in WT-p53-Zellen</u>	60
<u>Abbildung 27: Analyse des Einflusses von TRAIL-R2 auf die ZEB- und p53-vermittelte Regulation der Aktivität des miR200c-Promotors in WT-p53- und KO-p53-Zellen</u>	61
<u>Abbildung 28: Die pleiotrope Wirkung von Mitgliedern der p53-Familie</u>	68

<i><u>Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis</u></i>	<i>VI</i>
<i><u>Tabelle 2: Verwendete Zelllinie</u></i>	<i>18</i>
<i><u>Tabelle 3: Zusammensetzung sämtlicher verwendeter Lösungen und Puffer</u></i>	<i>18</i>
<i><u>Tabelle 4: Verwendete Kits</u></i>	<i>20</i>
<i><u>Tabelle 5: siRNAs</u></i>	<i>20</i>
<i><u>Tabelle 6: Verwendete Plasmide für die Luziferase-Assays</u></i>	<i>21</i>
<i><u>Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper für Western Blot Analysen sowie Immunpräzipitationen</u></i>	<i>21</i>
<i><u>Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot Analysen</u></i>	<i>22</i>
<i><u>Tabelle 9: Verwendete monoklonale Antikörper für Immunpräzipitationen, Immunfluoreszenzfärbungen, Imagestreamfärbungen sowie Luziferase-Assays</u></i>	<i>22</i>
<i><u>Tabelle 10: Verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz und Imagestreamfärbungen</u></i>	<i>23</i>
<i><u>Tabelle 11: Spektrale Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe</u></i>	<i>23</i>
<i><u>Tabelle 12: Verwendete Chemikalien</u></i>	<i>23</i>
<i><u>Tabelle 13: verwendete Geräte mit Herstellerangabe</u></i>	<i>25</i>
<i><u>Tabelle 14: Verwendete Verbrauchsmaterialien</u></i>	<i>26</i>

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Apaf1	Apoptotic protease activating factor 1
Bak1	Bcl-2-Antagonist/Killer 1/Bcl-2-homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCA	Bicinchoninic acid (Bicinchinoinsäure)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xl	B-cell lymphoma-extra large
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDK	Cyclin dependent kinase
CF	Zytosolische Fraktion
Chk1	Checkpoint kinase 1
CIP1	Cyclin dependent kinase inhibitor 1
Cu ²⁺ /Cu ⁺	Kupfer(I)/Kupfer(II)
DD	Death Domäne (Todesdomäne)
DGCR-8	DiGeorge syndrome critical region 8 (Pasha)
DISC	Death-Inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR4	Death Receptor 4 = TRAIL-R1
DR5	Death Receptor 5 = TRAIL-R2
Drosha	Class 2 ribonuclease III enzyme
DTT	Dithiothreitol
E2F2	Transkriptionsfaktor (TF)
ECL	Chemiluminescence detection reagent für Western Blot
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
et al.	et alii/aliae/alia
FADD	Fas associated via death domain
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
g	Gramm
GOF	Gain of function
h	hour (Stunde)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-Ethansulfonsäure
HGS-ETR1	Human Genome Science Extracellular TRAIL-Receptor 1, Mapatumumab

HGS-ETR2	Human Genome Science Extracellular TRAIL-Receptor 1, Lexatumumab
HMGA2	High-mobility group AT-hook 2
HRP	Meerrettich- (horseradish-) peroxidase
IP	Immunpräzipitation
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
Ksi	Kontroll siRNA
K-Ras	Kirsten (K)-rat sarcoma viral oncogene homolog
L	Liter
let-7	lethal-7
Lexa	Lexatumumab (HGS1)
Lin-28b	Lin-28 homolog B
M	Molar
mA	Miliampere
Mapa	Mapatumumab (HGS2)
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute/minutes
mind.	mindestens
miRNA	micro-RNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NF	Nukleäre Fraktion
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PAGE	Polyakrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PFA	Para-Formaldehyd
pre-miRNA	precursor micro-RNA
pri-miRNA	primary micro-RNA
R2si	TRAIL-R2 siRNA
RIPA	Radioimmunoprecipitation
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minutes
RT	Raumtemperatur
rTRAIL	rekombinantes TRAIL
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden
siRNA	small interfering RNA

s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
TBS-T	Tris-Buffered Saline and Tween 20
TGF β	Transforming Growth Factor β
TNF/TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TNM-Klassifikation	Tumor, Nodus (Lymphknoten), Metastasen
TRAIL	TNF- α related apoptosis inducing Ligand
TRAIL-R1	TRAIL Rezeptor 1
TRAIL-R2	TRAIL Rezeptor 2
TRAIL-R3	TRAIL Rezeptor 3
TRAIL-R4	TRAIL Rezeptor 4
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vol.-%	Volumen-Prozent
vs.	versus
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar

1. Einleitung

1.1 Das Tumorsuppressorprotein p53 – Funktionen, Bedeutung in der Tumorentstehung und -behandlung

Krebserkrankungen verzeichnen weltweit seit Jahren ein kontinuierliches Wachstum. Als Ursache hierfür werden neben einer stetig verbesserten Diagnostik vor allem der demographische Wandel sowie veränderte Umweltbedingungen angesehen. Auch in Deutschland stellen Krebserkrankungen mit aktuell ca. 500.000 Neuerkrankungen pro Jahr (Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert Koch Institut 2012) eine allgegenwärtige Bedrohung dar.

Äußerst bedeutend für die körpereigene Abwehr entarteter Zellen ist das im Jahr 1979 erstmalig beschriebene Tumorsuppressorprotein 53 (auch als Tp53 oder p53 bezeichnet) ¹. Mit voranschreitender Forschung wurden die herausragenden zellkontrollierenden und -stabilisierenden Funktionen deutlicher, sodass p53 bereits in den 1990er Jahren den Titel „Guardian of the Genome“ erhielt ². Diese Überwachung der Genomunversehrtheit beginnt mit einer Aktivitäts- und Expressionszunahme der nicht-mutierten Form des Tumorsuppressors, Wildtyp-p53 (kurz WT p53), bei Auftreten eines neuen Zellschadens ³.

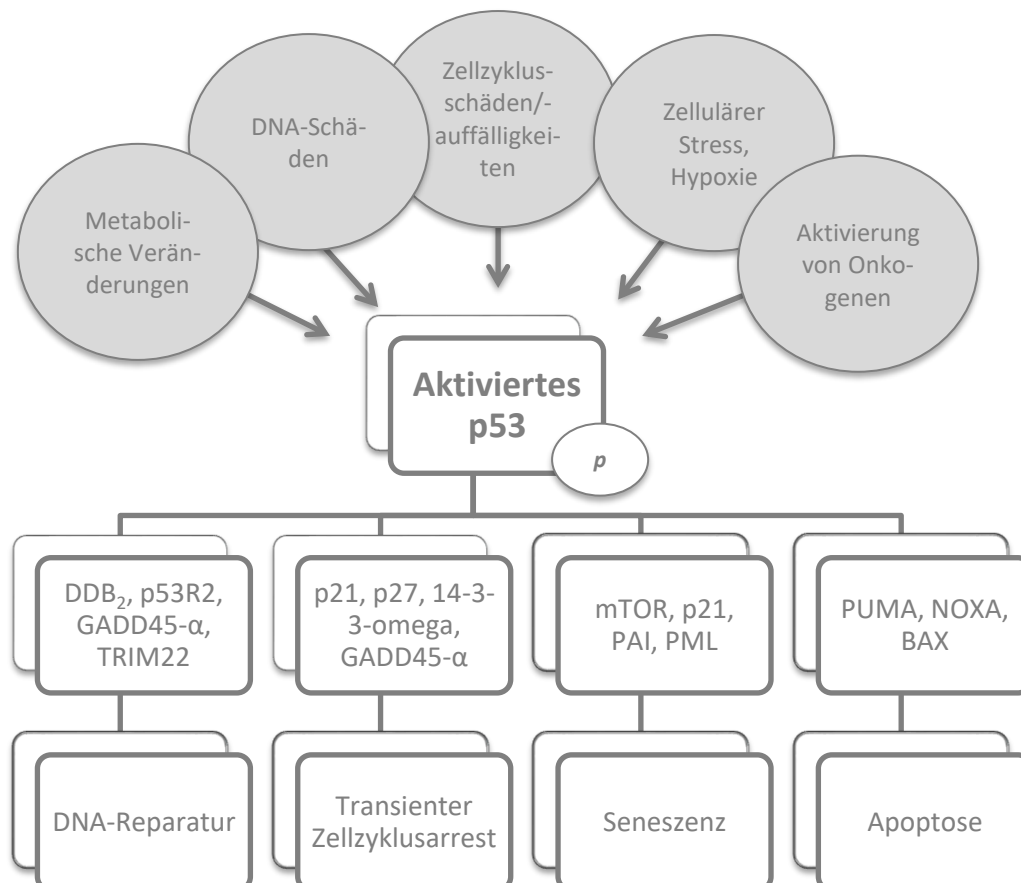


Abbildung 1: Funktionen von WT p53 in Bezug auf multifaktoriell bedingte Zellschädigung. Kommt es auf unterschiedlichsten Ebenen zu einer Schädigung von Zellen, wodurch eine fehlerfreie Zellteilung gefährdet wäre, spielt p53 in seiner tetramerischen Form durch seinen Einfluss als Transkriptionsfaktor auf multiple Gene eine entscheidende Rolle in der Eindämmung dieses Schadens. Je nach Ausmaß der verlorenen Zellstabilität, kann p53 zu einem transienten oder irreversiblen Zellzyklusarrest führen. Eingeleitete DNA-Reparaturmechanismen führen zum Zellüberleben oder bei gravierenderen sowie nicht reparablen Störungen zur Seneszenz oder Apoptose. Durch die einleitenden Mechanismen kann einer Malignitätsentwicklung entgegengewirkt oder diese gar verhindert werden. *DDB2: DNA damage-binding protein 2; GADD45α: growth arrest and DNA damage-inducible protein 45α; mTOR: mammalian target of rapamycin; p: Phosphorylierung; p53R2: p53-inducible ribonucleotide reductase small subunit 2-like protein; PAI: plasminogen activator inhibitor; PML: promyelocytic leukaemia; TRIM22: tripartite motif-containing protein 22*

P53 wird in Zellen zwar ständig exprimiert, liegt jedoch unter normalen Umständen, also ohne vorliegende Zellgefährdung im Rahmen zellschädigender Reize, nur in geringer Konzentration vor. Verantwortlich hierfür ist ein kontinuierlicher Abbau durch seinen wichtigsten negativen Regulator, dem sog. MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*)⁴. Dieses kann durch direkte Bindung an den Aminoterminus von p53 dessen Funktionalität unterbrechen und ebenso als E3-Ubiquitin-Ligase über Ubiquitinierung seine proteolytische Degradierung katalysieren. Der Abbau erfolgt sodann im Proteasom der Zelle. Die Expression von MDM2 selbst wird wiederum durch p53 induziert⁵. Zusammenfassend ist dieser Vorgang als autoregulatorische Rückkopplungsschleife zu beschreiben, um die Konzentration an p53 bei Abwesenheit von zellulärem Stress niedrig zu halten⁶.

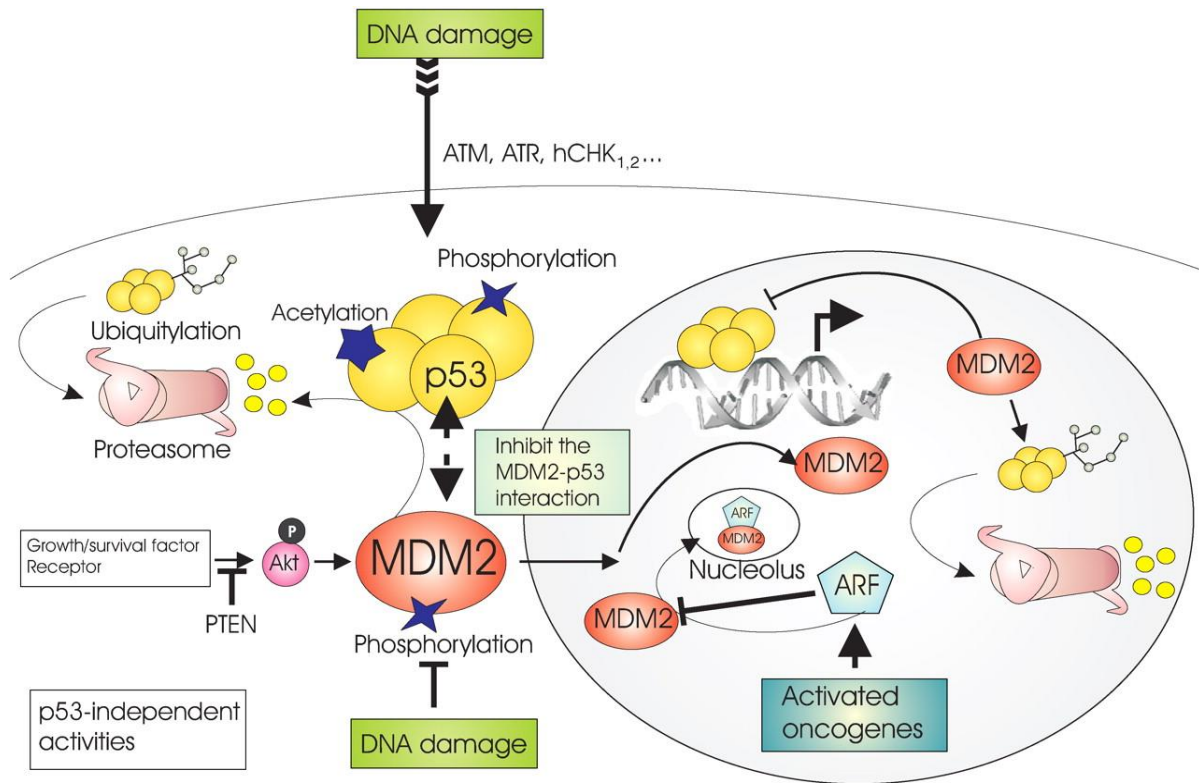


Abbildung 2: Regulation von p53 durch MDM2 (Moll & Oleksi, Molecular Cancer Research, 2003). Zwischen p53 und MDM2 besteht eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife. P53 induziert die Expression von MDM2. MDM2 wiederum inhibiert bei Unversehrtheit der Zelle die Aktivität von p53, indem es dessen Degradation im Kern und Zytoplasma bedingt. Die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor ist damit blockiert und der Transport aus dem Kern wird gefördert. Kommt es zur Zellschädigung, wird p53 durch Phosphorylierung aktiviert, eine Interaktion zwischen p53 und MDM2 hiermit, oder aber auch durch Aktivierung von ARF-Proteinen und folglich einer Sequestrierung in den Nucleolus, unterbunden.

Liegt nun eine der beschriebenen Situationen vor, in denen p53 in seine aktive Form überführt werden muss, kommt es zur posttranslationalen Modifizierung in Form von u.a. Acetylierung, Glykosylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Ribosylierung und Konformationsänderung³. Durch Phosphorylierung von p53 wird die Komplexbildung mit MDM2 verhindert, so dass der Tumorsuppressor in der Zelle akkumuliert und nicht abgebaut wird⁷.

Ebenso kann eine Aktivierung durch den Einfluss von p14^{ARF} (*ARF: alternative reading frame*, alternatives Genprodukt des CDKN2A-Locus) erreicht werden. Dieses bindet an den MDM2-/p53-Komplex und verhindert deren Interaktion sowie den normalen Ablauf des Abbaus^{8,9}. Aktiviertes WT p53 kann als Transkriptionsfaktor an „p53-responsive-elements“ in den Promotorregionen einer Großzahl seiner Zielgene binden und deren Transkription anregen oder

hemmen. Diese regulierten Gene veranlassen daraufhin das Einleiten von DNA-Reparaturmechanismen, den reversiblen oder irreversiblen Zellzyklusstopp sowie den programmierten Zelltod. Welches dieser Programme letztlich abläuft, wird durch den Schweregrad des jeweiligen Schadens, der vorliegenden Zellstabilität und den Zelltyp bestimmt ¹⁰. Der Zellzyklusstopp wird vor allem über eine gesteigerte Genexpression von p21 (Synonym: p21^{WAF1/CIP1} bzw. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1*) erreicht. Über eine Hemmung von CDK-Cyclin-Komplexen (genauer: Cyclin-E/CDK2-, Cyclin-D/CDK4, 6-Komplexen) bleibt ein weiterer Tumorsuppressor mit zellzyklusregulierenden Eigenschaften, das Retinoblastom-Protein, an dem Transkriptionsfaktor E2F gebunden, sodass es zu einem Stillstand des Zellzyklus mit einer Unterbrechung des Übergangs von der G₁- (Gap-1-) zur S- (Synthese-) Phase sowie von der G₂- (Gap-2) Phase zur Mitose kommt. Eine DNA-Replikation findet, solange die Reparaturmechanismen anhalten, somit nicht mehr statt, wodurch sich die mit mutierter DNA geschädigten Zellen nicht weiter vermehren ¹¹. Weiterhin ist bekannt, dass es auch zu einem irreversiblen Zellzyklusstopp kommen kann. Demnach gehen die Zellen nach dem Ablauf der DNA-Reparatur in den Status der Seneszenz über ¹². Ist der Zellschaden nun zu gravierend oder die DNA-Reparatur nicht ausreichend, leitet WT p53 durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen den programmierten Zelltod ein ¹³. Es können hierbei sowohl ein intrinsischer oder mitochondrialer als auch ein extrinsischer (Todesrezeptoren-getriggert) Weg unterschieden werden. In die Mitochondrien verlagertes p53 kann die Expression von Apoptose-fördernden Proteinen der Bcl-2-Familie wie z.B. Bax steigern, sodass die Kaskade des intrinsischen Zelltodprogramms ausgelöst wird. Bax führt zu einer Permeabilisierung der Mitochondrienmembran, wodurch Cytochrom C in das Zytosol freigesetzt wird. Dieses formt sodann mit APAF-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*) und der Procaspase-9 einen als Apoptosom bezeichneten Komplex. Die im Folgenden autolytisch aktivierte Caspase-9 sorgt wiederum für die Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7, die Zellproteine spalten und somit zum Zelluntergang führen ¹⁴. Der zweite, extrinsische Weg kann seitens p53 auf zwei verschiedene Weisen ausgelöst werden, wobei nur der für die vorliegende Arbeit relevante, über Ligandenbindung an sog. Todesrezeptoren ausgelöste Weg erläutert wird. Es ist bekannt, dass TRAIL-R 1 und -2 (*TNF-related apoptosis-inducing-ligand receptor 1 und 2*) bei gravierendem Zellschaden von aktiviertem p53 hochreguliert werden können ^{15,16}. Hierauf wird im Kapitel 1.2 „Der TRAIL-induzierte apoptotische Signalweg“ nochmals eingegangen.

Anhand der Bedeutung der beschriebenen Mechanismen für die Zellstabilität und -integrität ist es wenig verwunderlich, dass es bei einem gestörten Ablauf dieser Funktionen zu fatalen Folgen kommen kann. So ist seit 1969 das sogenannte „Li-Fraumeni-Syndrom“ bekannt: eine autosomal-dominant vererbte Mutation des Tumorsuppressorgens p53, welches mit bereits in frühen Lebensjahren gehäuftem Auftreten von Krebsentitäten einhergeht^{17,18}.

Zusätzlich ist erforscht, dass in den meisten (>50%) menschlichen Tumoren eine mutierte Variante des p53-Gens vorliegt¹⁹. Am häufigsten zeigen sich hierunter „Missense-Mutationen“ innerhalb der DNA-Bindungsdomäne, die dazu führen, dass es durch einen Austausch einer Aminosäure zur Destabilisierung des Proteins oder aber zum vollständigen Funktionsverlust kommt. Das inaktive p53 ist nicht mehr in der Lage an die DNA der Zielgene zu binden und verliert damit seine Funktion als Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor^{6,20}. Geschädigte, potentiell maligne Zellen werden daher nicht mehr den Reparaturmechanismen oder der Eliminierung zugeführt. Des Weiteren erklärt sich hierdurch auch, dass bei einer vorliegenden p53-Mutation Radio- oder Chemotherapien weniger effektiv bzw. die Zellen gänzlich therapieresistent werden, da die durch die Therapie veränderten Zellen nicht in das Apoptoseprogramm eingeschleust werden können^{21,22}. Eine potentiell ungehinderte Proliferation von malignen Zellen und zugleich wesentlich schlechtere Prognose bei bereits vorliegender Tumorerkrankung sind somit Folgen der p53-Genmutation^{23,24}.

Neben dem eigentlichen Funktionsverlust, besteht die Möglichkeit, dass p53 auch neue, onkogene Eigenschaften hinzugewinnt. Dies wird auch als „Gain-of-function“-Mutation bezeichnet²⁵. Unter anderem wurde herausgefunden, dass mutiertes p53 einerseits die Expression von NFκB (*nuclear factor kappa B*) hochreguliert als auch dessen Antwort auf TNF- (Tumornekrosefaktor-) α in Tumorzellen verlängert und somit den Entartungsprozess aufgrund von chronischer Inflammation fördert²⁶. Als weiteres Beispiel sei die Beeinflussung der Angiogenese genannt, die über eine Aktivierung des VEGF- (*Vascular endothelial growth factor*-) Pathways zur Besserung der Tumorversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen führt, wodurch folglich dessen Wachstum vorangetrieben wird²⁷. Dies geschieht einerseits über indirekte Repression der VEGF-Expression durch Interaktion und Inhibition der Transkriptionsfaktoren SP1 (*specificity protein 1*) oder E2F^{28,29}. Andererseits kann p53 in der Frühphase von Hypoxie die Degradierung des Transkriptionsfaktor HIF-1α (*hypoxia-inducible factor-1α*) fördern³⁰. Dieser reguliert die Sauerstoffversorgung der Zelle und wird, vergleichbar mit p53, bei Normoxie bzw. Unversehrtheit der Zelle in seiner Konzentration durch Hydroxilierung niedrig gehalten. Bei

Hypoxie ist dieser Abbau gehemmt, sodass eine Stabilisierung von HIF- α erfolgt. Dieser kann sodann Gene aktivieren, welche zur Anpassung der Zelle an die mangelnde Sauerstoffversorgung führen³¹. Letztlich verliert WT p53 durch diese Mutationen seine Funktionen und die Grundsteine maligner Entartung werden begünstigt: Vererbung von beschädigtem Erbgut, ungehemmte Zellproliferation, Angiogenese, Verlust der Zellstabilität und -integrität sowie damit einhergehende mögliche Metastasierung.

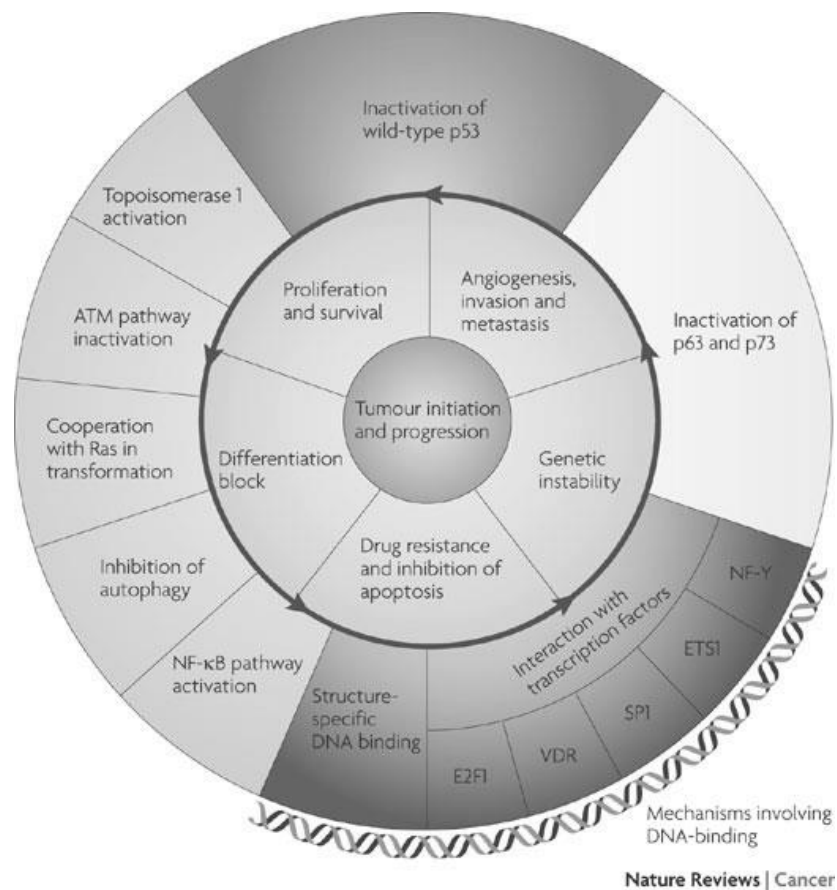


Abbildung 3: Ausgewählte Eigenschaften von mutiertem p53 und dessen zugrundeliegende Mechanismen (Brosh & Rotter, Nature Reviews Cancer, 2009). Beispielhaft aufgezeichnet sind einige p53-GOF-Mutationen. Der äußerste Kreis zeigt die zugrunde liegenden Mechanismen, die zu den onkogenen Funktionen von mutiertem p53 führen. Die mit Pfeilen versehene Kreisumrandung deutet an, dass der innere Kreis variabel zu platzieren ist: die Folgen wie Therapieresistenz oder vermehrte Proliferation sind also nicht auf einen bestimmten Mechanismus zurückzuführen, sondern können durch jeden einzelnen der hier aufgezeigten ausgelöst werden.

P53 muss allerdings nicht direkt von Veränderungen betroffen sein, um in seinen Funktionen eingeschränkt zu sein. So konnte gezeigt werden, dass das MDM2-Protein in vielen Tumoren überexprimiert vorliegt und durch den damit permanent ablaufenden Abbau von p53 dessen Level niedrig hält. Auch hierdurch kann p53 seine Funktionen nur stark abgeschwächt bis gar nicht ausführen³². P53 ist auch nach über 30 Jahren eines der attraktivsten Forschungsziele,

nicht zuletzt aufgrund der prozentualen Häufigkeit an auftretenden Mutationen in einer Vielzahl von Tumoren. Die komplexen Verwicklungen in viele molekulare Bahnen sowie auftretende Therapieresistenzen fordern eine weitere Detektion von Interaktionspartnern, Einflussfaktoren oder -wegen, um bestmögliche Therapiestrategien entwickeln zu können.

1.2 TRAIL und seine Rezeptoren

Der zu den Zytokinen zählende Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand „TRAIL“, ein Typ-II-Transmembranprotein, wurde erstmals 1995 beschrieben und wird größtenteils von Zellen des Immunsystems exprimiert³³. Eine seiner bedeutendsten Eigenschaften ist die Fähigkeit den programmierten Zelltod (Apoptose) auszulösen³⁴. Die der TNF-Superfamilie angehörenden Zellmembran-gebundenen TRAIL-R1 und R2 sind sogenannte Todesrezeptoren, die nach Aktivierung durch Bindung von TRAIL sowohl apoptotische als auch nicht-apoptotische Signale, wie Inflammation oder Invasion, induzieren können³⁵. Die Rezeptoren gehören zu den Typ-I-Transmembranproteinen und besitzen eine zytoplasmatische Todesdomäne, mittels derer sie die Apoptosesignalkaskade einleiten können³⁶. Darüber hinaus sind die beiden ebenfalls membranständig vorliegenden TRAIL-R3 und R4 (auch „Decoy-Rezeptoren“) sowie der lösliche Rezeptor Osteoprotegerin (OPG) bekannt³⁷. Den Decoy-Rezeptoren ist gemeinsam, dass sie aufgrund einer fehlenden zytoplasmatischen (TRAIL-R3) bzw. trunkierten (TRAIL-R4) Todesdomäne zwar TRAIL anlocken und binden können, jedoch entgegen TRAIL-R1 und -R2 nicht dazu befähigt sind, den programmierten Zelltod auszulösen^{38,39}. Da die Decoy-Rezeptoren mit den anderen Rezeptoren ebenfalls um eine Ligandenbindung von TRAIL konkurrieren, führt dies v.a. bei ihrer Überexpression zu einer indirekten, kompetitiven Apoptosehemmung⁴⁰. OPG kann neben TRAIL mit deutlich höherer Affinität RANKL binden und spielt eine Rolle in der Osteoklastenregulation des Knochenstoffwechsels⁴¹. Die Auswirkung der TRAIL-Interaktion ist bisher nicht ausreichend geklärt, da eine Bindung bei physiologischen Temperaturen nur schwach zustande kommt⁴².

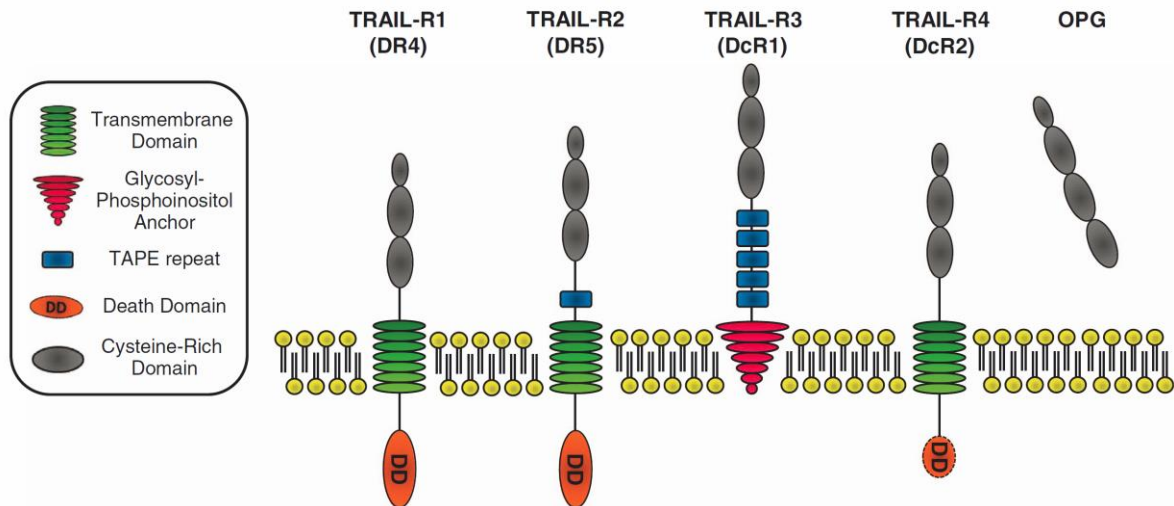


Abbildung 4: Übersicht der bekannten, beim Menschen vorkommenden TRAIL-Rezeptoren (Lemke et al., Cell Death and Differentiation, 2014). Dargestellt sind die beim Menschen beschriebenen Todesrezeptoren, an die der Ligand TRAIL binden kann. Hierunter befinden sich vier membrangebundene Rezeptoren sowie ein löslicher. Über ihre Todesdomäne sind die TRAIL-R1 (auch: DR4) und -R2 (auch: DR5) zur Apoptoseinduktion fähig. Im Gegensatz dazu stehen die TRAIL-R3 (auch: DcR1) und -R4 (auch DcR2), die aufgrund einer fehlenden intrazellulären (TRAIL-R3) oder trunkierten (TRAIL-R4) Todesdomäne zwar ihren Liganden binden, aber kein Apoptoseprogramm auslösen können. Als Rezeptor für RANKL ist Osteoprotegerin bekannt, der vor allem in der Osteoklastenregulation eine bedeutende Rolle spielt. Aufgrund seiner unter physiologischen Temperaturbedingungen lediglich schwachen Affinität zu TRAIL, bleibt die Relevanz dieser Interaktion vorerst unklar.

1.3 Der TRAIL-induzierte apoptotische Signalweg

Die Einleitung des programmierten Zelltods beginnt mit der Bindung von trimerisierten TRAIL an einen der Todesrezeptoren, woraufhin es zu einer Trimerisierung der Rezeptoren und einer anschließenden Bildung zu Homo- oder Heterokomplexen kommt ⁴³. Über die so entstandenen geclusterten Todesdomänen kann das Adaptorprotein FADD (*Fas-associated protein via death domain*) rekrutiert werden. Zusammen mit den Todesrezeptoren sowie den Initiatorcaspasen 8 und 10 wird der sogenannten DISC (*death-inducing signalling complex*) gebildet ⁴⁴. Innerhalb des DISC kommt es durch Spaltung der Procaspase 8 zur Aktivierung der Caspase 8, die ihrerseits direkt eine Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 verursachen kann ⁴⁵. Bei Zellen, die den beschriebenen Zelltod einleiten, spricht man von „Typ-I-Zellen“. In „Typ-II-Zellen“ ist aktivierte Caspase 8 nicht in ausreichender Menge vorhanden, um die Effektorcaspasen zu aktivieren ⁴⁶. Hierbei wird der intrinsische Weg des programmierten Zelltods ausgeführt, bei dem Caspase-8 das der Bcl-2-Familie angehörige pro-apoptotische Protein Bid spaltet, woraufhin dieses in die Mitochondrienmembran transloziert. Mittels Interaktion mit den ebenfalls pro-apoptotischen Regulatorproteinen Bax und Bak kommt es zur Permeabilisierung

der Mitochondrienmembran und zur Freisetzung von Cytochrom C^{47,48}. Im Zytoplasma bindet Cytochrom C an das Adaptorprotein Apaf1 und formt hierdurch das Apoptosom, welches die Caspase-9 aktiviert und letztlich über eine Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 zur Apoptose führt⁴⁹.

1.4 TRAIL-induzierte nicht-apoptotische Signalwege

Neben der Induktion des programmierten Zelltods ist bekannt, dass TRAIL ebenfalls über seine Rezeptoren 1 und 2 nicht-apoptotische Signalwege aktivieren kann. Durch die Expression proinflammatorischer, migrations- und invasionsfördernder Proteine resultieren diese Wege in der Förderung maligner Tumorprogression⁵⁰. TRAIL führt u.a. zu einer Aktivierung von NFκB, Src, PKB (Proteinkinase B)/Akt, PKC (Proteinkinase C), MAP- (*mitogen-activated-protein-*) Kinasen wie p38, ERK1/2 (*extracellular-signal-regulated-kinase 1/2*) oder JNK (*c-Jun N-terminal kinase*)^{51,52}. Diese können ihrerseits z.B. über eine Hemmung apoptosefördernder Proteine wie Bid sowie über eine Hochregulation proinflammatorischer, apoptosehemmender Proteine wie cFLIP (*cellular FLICE inhibitory protein*), IAP (*inhibitor of apoptosis proteins*) oder Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*) den programmierten Zelltod verhindern⁵³. Des Weiteren konnte für hämatopoetische sowie Pankreasadenokarzinomzellen gezeigt werden, dass z.B. eine Aktivierung von NFκB sowie der Proteinkinase C (PKC) zu einer Resistenz der Tumorzellen gegenüber TRAIL-ausgelöster Apoptose führt^{54,55}. In vivo wurde eine Zunahme der Tumormalignität sowie die damit von TRAIL verursachten, kanzerogenen Effekte anhand einer TRAIL-Behandlung von immundefizienten, mittels Pankreasadenokarzinomzellen behandelte Mäuse bestätigt. Hier zeigte sich eine vermehrte Metastasierungsrate⁵⁶.

Neuerdings ist bekannt, dass es neben der Apoptose auch einen weiteren Weg des programmierten Zelltodes, die programmierte Nekrose, gibt. Es wurde gezeigt, dass TRAIL diesen als Nekroptose bezeichneten Mechanismus in Tumorzellen ebenfalls auslösen kann⁵⁷. Nach Ligandenbindung an die TRAIL-Rezeptoren kommt es Caspase-unabhängig und über das Nekrosom, welches aus einem Komplex der beiden Kinasen RIP 1 und RIP 3 (*Receptor-interacting protein 1 und 3*) besteht, über die Aktivierung der Pseudokinase MLKL (*Mixed lineage kinase domain-like protein*) zu einer regulierten Nekrose, bei der es zu einem Verlust der Integrität der Zellmembran kommt^{58,59}. Einen wichtigen Einfluss hat die Nekroptose auf das Entzündungsgeschehen und das Immunsystem⁶⁰.

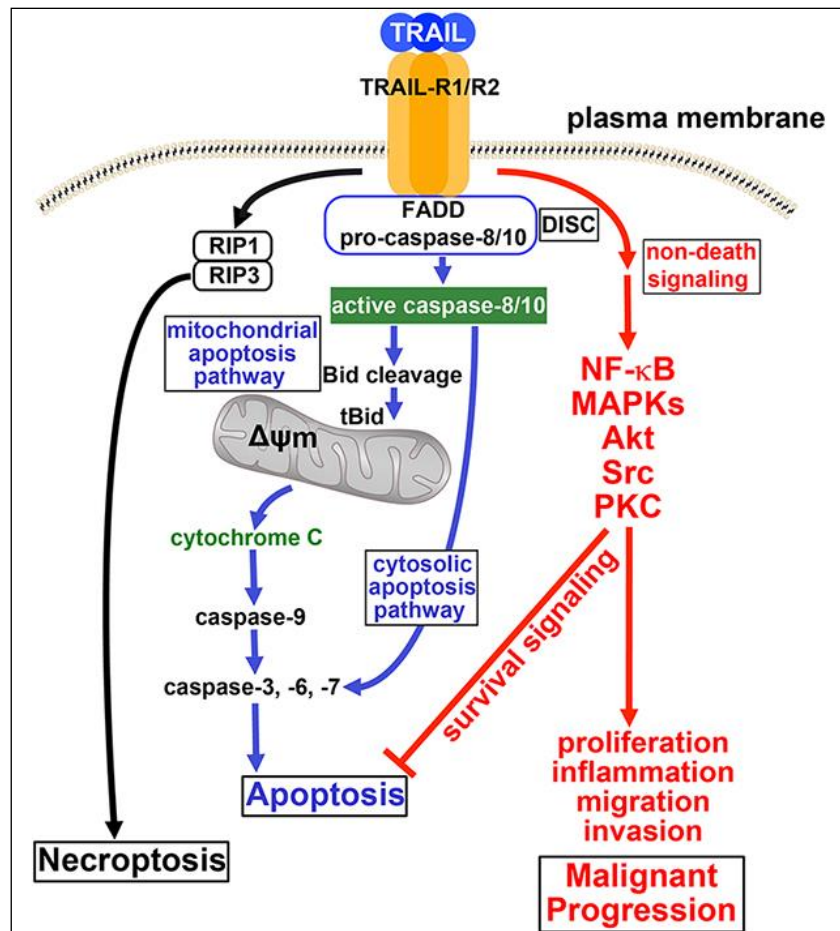


Abbildung 5: TRAIL-induzierte apoptotische und nicht-apoptotische Signalwege (Bertsch et al., 2014). Aufgezeigt sind die TRAIL-induzierten Funktionen der plasmamembranständigen TRAIL-Rezeptoren 1 und 2. Die genauen Abläufe sind dem Textabschnitt 1.4 zu entnehmen. Akt: Protein Kinase B; Bid: BH3 interacting-domain death agonist; FADD: Fas-associated protein with death domain; MAPKs: Mitogen-activated protein kinases; PKC: Proteinkinase C; RIP1 oder 3: Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 oder 3; Src: Tyrosinkinase Src

1.5 Funktionen des nukleären TRAIL-R2

Bisher lag das Hauptaugenmerk der Forschung im Bereich der TRAIL-Rezeptoren auf deren Funktionen bei einer vorliegenden Expression auf der Plasmamembran, wenn auch das Vorkommen im Zytoplasma oder Zellkern bereits beschrieben wurde⁶¹. Interessanterweise zeigt allerdings eine Mehrzahl von Tumoren stark erhöhte intrazelluläre und intranukleäre Mengen an TRAIL-R1 und/oder -R2 – ein Aspekt, der häufig mit einer schlechten Prognose für Krebspatienten als auch mit einer Resistenz gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose einhergeht^{61–63}. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Anna Trauzold konnte eine pro-tumorale Funktion des nukleären TRAIL-R2 zeigen. Sofern im Zellkern vorhanden, interagiert TRAIL-R2 durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Proteinen, die entscheidende Regulatoren des

Mikroprozessorkomplex darstellen und hemmt darüber ligandenunabhängig die Prozessierung der zu den miRNAs gehörenden let-7-Familie. Infolge der erniedrigten let-7-Level resultiert eine gesteigerte Expression seiner pro-tumoralen Targetproteine wie HMGA2 und LIN28b, die nachfolgend über Proliferationssteigerung sowie De-Differenzierung der Tumorzellen zu einer malignen Progression beitragen ^{64,65}.

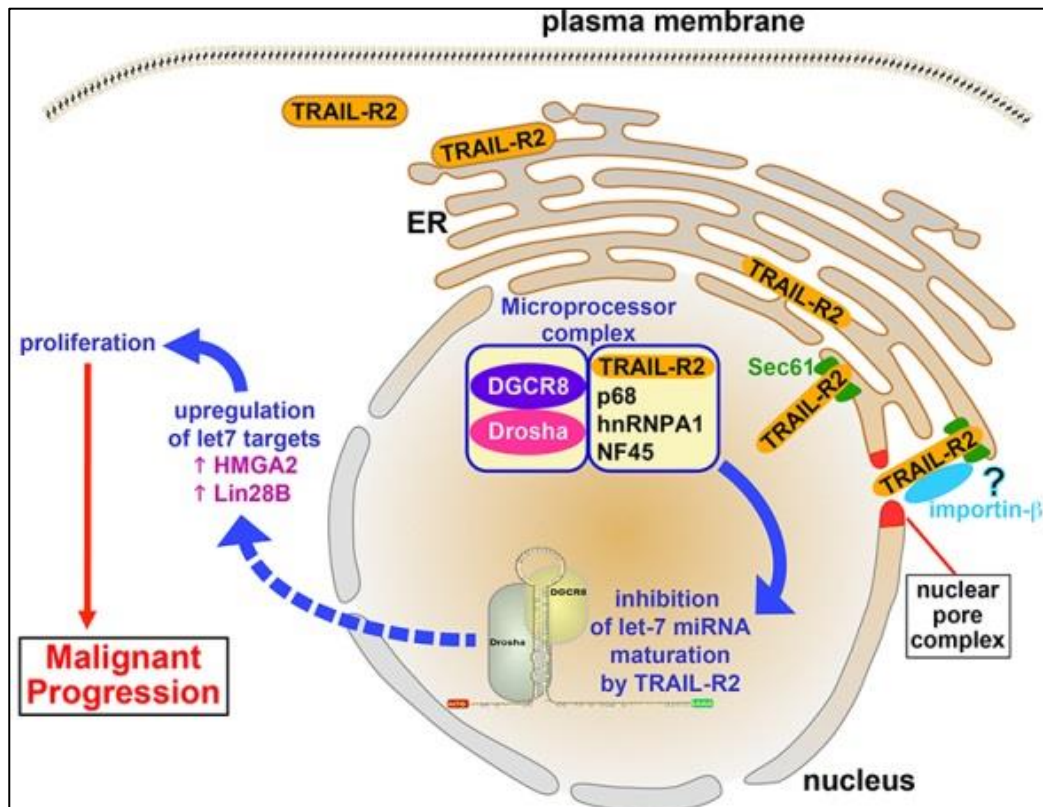


Abbildung 6: Übersicht der Funktionen von nukleärem TRAIL-R2 (Bertsch et al., 2014). Dargestellt ist die Interaktion zwischen TRAIL-R2 und den Proteinen des Mikroprozessorkomplexes im Zellkern. Über diese Interaktion wird die Reifung (Maturation) der let-7-miRNA gehemmt. Als Resultat dieser Hemmung kommt es letztlich zu einer vermehrten Expression der let-7-Targeten und damit einhergehend einer Tumorprogression.

1.6 Mikro-RNAs und deren Biogenese

Bei Mikro-RNAs (miRNAs) handelt es sich um kleine, nicht-kodierende RNA-Moleküle, die eine wichtige Rolle in der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression besitzen. Sie binden ihre komplementäre Ziel-Messenger-RNA (mRNA) und hemmen dann entweder deren Translation oder führen zu deren Degradation ⁶⁶⁻⁶⁸. Es wird angenommen, dass mind. 30 % der

menschlichen Gene durch miRNAs reguliert werden⁶⁹, wovon jede für sich, bei einer geschätzten Gesamtheit von über 2500 miRNAs (Daten aus dem Jahr 2019,⁷⁰ die Expression mehrerer Zielgene gleichzeitig steuern kann⁷¹. Von Bedeutung sind miRNAs vor allem bei Prozessen, die einen Einfluss auf die Entwicklung, Zelldifferenzierung und -proliferation sowie den programmierten Zelltod nehmen⁷². Auch wenn viele ihrer biologischen Effekte noch nicht weitergehend erforscht sind, gibt es viele Hinweise, dass miRNAs auch an der Entstehung von Krankheiten, wie Krebs oder Stoffwechselstörungen, beteiligt sind. Z.B. wurden dysregulierte miRNA-Expressionen in verschiedenen Krebsentitäten gefunden. Diese in Zusammenhang mit Krebs stehende miRNAs nennt man auch „*oncogenic miRNAs*“ (oncomiRs)^{73–76}.

Die Synthese von miRNAs beginnt im Zellkern mit der Transkription zu einer primary miRNA (pri-miRNA). Diese wird durch den Mikroprozessor, bestehend aus dem Klasse-II-RNase-Enzym „Drosha“ zusammen mit dem RNA-bindenden Protein DGCR8/Pasha sowie weiteren akzessorischen Proteinen, u.a. p68, hnRNP1a, NF45 und NF90/110, zu einer precursor miRNA (*pre-miRNA*) prozessiert^{77,78}. Als nächster Schritt erfolgt der Export vom Zellkern in das Zytoplasma mittels Exportin-5 (EXP-5)⁷⁹, wo die Maturierung anhand des RISC (*RNA-induced silencing complex*) fortgesetzt wird. Dieses besteht aus dem Klasse-III-RNase-Enzym „Dicer“ sowie den Proteinen PACT, Argonaut 2, TRBP und GW182, die aus der pre-miRNA die reife, funktionsfähige miRNA produzieren⁸⁰. Zuletzt sei aufgeführt, dass WT p53 einen immensen regulatorischen Einfluss auf die Expression von miRNAs hat. Zum einen nutzt p53 in diesen Fällen seine Eigenschaften als Transkriptionsfaktor, indem es die Expression von miRNA-Genen reguliert, zum anderen beeinflusst es die miRNA-Reifung durch direkte Interaktion mit der RNA-Helikase p68 des Mikroprozessorkomplexes⁸¹.

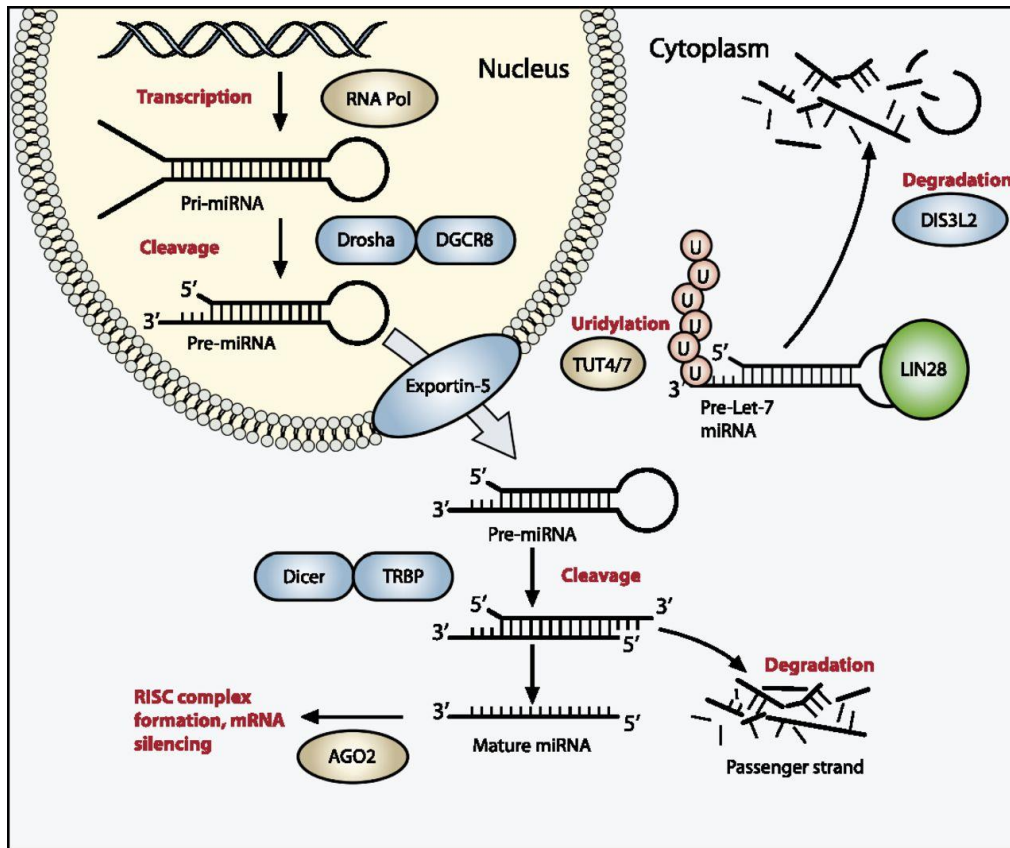


Abbildung 7: Entstehung der Micro-RNAs (Hohenstein et. al., 2015). Dargestellt ist die Prozessierung von miRNAs sowie deren Funktionsmechanismen. Im Kern erfolgt die Transkription der für die primary miRNA kodierenden Gene durch die Polymerase II sowie die weitere Prozessierung zur precursor miRNA durch den Mikroprozessorkomplex. Via Exportin-5 erfolgt der Transport vom Zellkern in das Zytoplasma, wo die pre-miRNA durch die RNase Dicer und TRBP gespalten wird. Es entstehen zwei einzelsträngige miRNAs, von denen der funktionale Strang an Argonaute 2 (Ago2) und damit an den RISC bindet und anschließend zur Ziel-Messenger-RNA geleitet wird. Der nicht funktionale Strang wird degradiert.

1.7 Micro-RNAs und epidermale-mesenchymale Transition

Epidermale-mesenchymale Transition (EMT) stellt einen entscheidenden Prozess im Rahmen embryologische Entwicklungs- sowie Wundheilungsprozesse aber auch Fibrosierung und maligner Entartung dar ⁸². Epitheliale Zellen verlieren bei diesem Vorgang nach und nach ihre epithelialen Eigenschaften als auch Zellpolarität und gehen zu einem mesenchymalen Phänotyp über. Dies geschieht über Herunterregulation von Proteinen wie E-cadherin, α -, β - sowie γ -catenin, sodass die Zell-Zell-Kontakte aufgelöst werden und sich die Zellen aus ihrem Zell-Zell-Verband lösen können. Durch Erlangen mesenchymaler Eigenschaften werden die Zellen mobiler, können das Zytoskelett reorganisieren und in umliegende Gewebe sowie Lymph- oder Blutgefäße einwandern ⁸³. Dieses Programm geht einher mit einer Heraufregulation von

mesenchymalen Proteinen, wie Fibronectin, Vimentin oder N-cadherin. Wichtige Induktoren der EMT sind die Transkriptionsfaktoren wie Twist, Snail1/2 und die ZEB-Familie ⁸⁴. Der Prozess der EMT ist umkehrbar, sodass mesenchymale Zellen wieder epitheliale Eigenschaften erlangen (*mesenchymal to epithelial transition = MET*). Generell ist bekannt, dass diese Vorgänge, wie eingangs erwähnt, wichtig für Embryogenese und Zellentwicklung sind. Jedoch wurde zunehmend bekannt, dass beide Wege, EMT als auch MET, eine wichtige Rolle bei Tumorentstehung als auch -progression spielen ^{85,86}. EMT verhilft zur Zelldissemination und Erlangung von stammzellhaften Eigenschaften ⁸⁷, während der umgekehrte Ablauf der MET einen entscheidenden Einfluss auf die Krebszellen-Re-Differenzierung sowie das Ansiedeln von Metastasen zu haben scheint ⁸⁸.

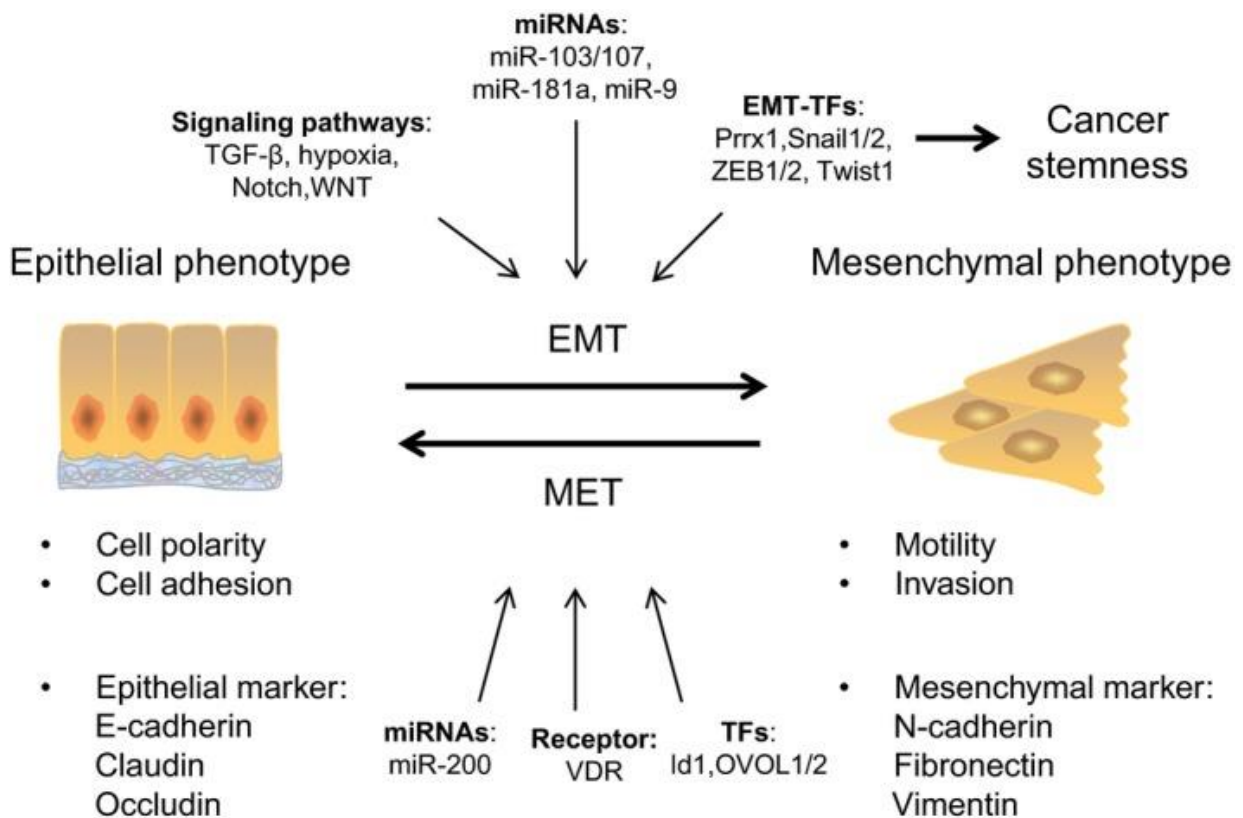


Abbildung 8: Erläuterung des Ablaufs sowie der Einflussfaktoren von MET und EMT (Liao und Yang, 2017). Nach Einwirken verschiedener Trigger, können Zellen von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp übergehen. Dies geht einher mit einer Suppression von epithelialen und Hochregulation von mesenchymalen Markern. Dadurch erlangen die Zellen die Möglichkeit sich aus ihrem Zellverband zu lösen, migrieren und u.a. stammzellhafte Eigenschaften zu gewinnen. Dieses Programm kann auch andersherum ablaufen, was sich in einem Übergang von einem mesenchymalen zu einem epithelialen Phänotyp äußert.

Die beiden Prozesse stehen unter dem Einfluss verschiedener aktivierter Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Id1, OVOL1/2 sowie miRNAs. Von besonderem Interesse, auch für die vorliegende Arbeit, sind zwei regulatorische Netzwerke, welche miR34-SNAI1 and miR200-ZEB1 umfassen. Im Folgenden wird auf die miR200-ZEB1-Achse eingegangen. Es besteht eine doppelte negative Feedbackschleife zwischen der miR200-Familie ((miR-200a, -200b, -200c, -141 und -429) und ZEB1 sowie -2. Zinc-Finger E-Box-binding homeobox Proteine 1 und 2 spielen eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung und -progression⁸⁹ und werden ihrerseits durch Mediatoren wie TGF- β (*transforming growth factor beta*) oder TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) aktiviert⁸⁶. Es konnte gezeigt werden, dass ein Ausschalten von ZEB-1 und -2 zu einer gesteigerten Expression der miR200-Mitglieder führt, während ZEB-Familienmitglieder einen hemmenden Einfluss auf die Transkription der miR200 nehmen⁹⁰. Demnach hängt die Zellstabilität in diesem Konstrukt von der jeweilig aktivierten Säule ab: hochregulierte ZEB-Moleküle führen über eine Hemmung der miR200-Familie zu einem mesenchymalen Phänotyp, der zur Migration und Differenzierung befähigt ist, während hochregulierte miR200-Familienmitglieder genau das Gegenteil erreichen und repressiv auf die EMT wirken⁹¹⁻⁹³. Die Funktionen von p53 in diesem Netzwerks wird an anderer Stelle besprochen.

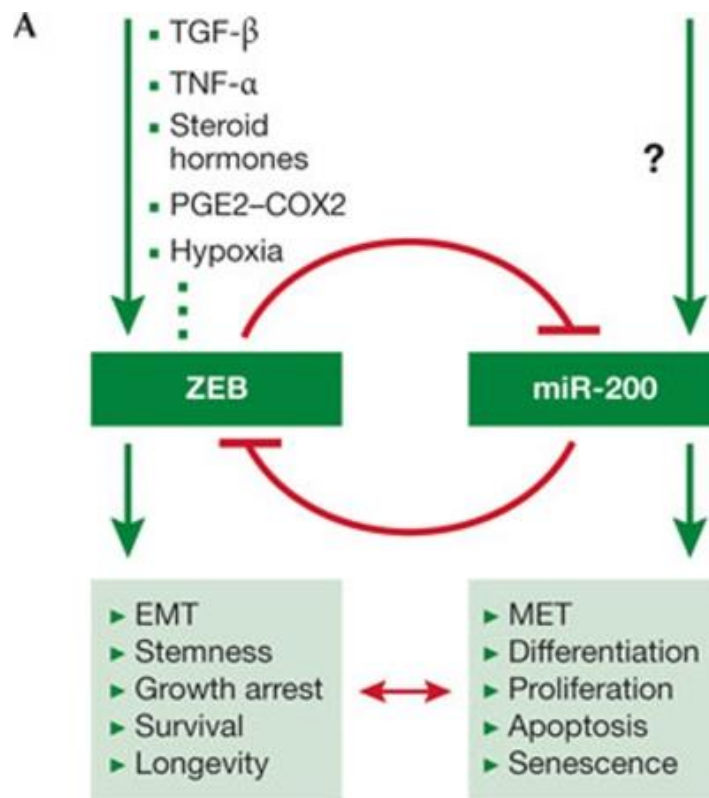


Abbildung 9: Schematische Darstellung der negativen Feedbackschleife zwischen miR200-Familie und ZEB (S. und T. Brabletz, 2010). Dargestellt ist die gegenseitige Expressionsblockade von ZEB und miR200. ZEB-Faktoren können hierbei auf transkriptioneller Ebene die Gene der miR-200-Familie unterdrücken, während die miR-200-Faktoren ZEB auf post-transkriptioneller Ebene hemmen können. Dadurch kommt es entweder zur Aktivierung der mesenchymalen zu epithelialen Transition (MET) oder zum reversen Programm, der epithelialen zu mesenchymalen Transition (EMT). *miR: microRNA, TGF- β : transforming growth factor beta, TNF- α : tumor necrosis factor alpha, ZEB: zinc-finger enhancer binding.*

1.8 Die Bedeutung von TRAIL und TRAIL-R für die antitumorale Therapie

Es wurde herausgefunden, dass TRAIL seine Signalkaskade präferenziell in Tumorzellen induziert und auf gesunde Zellen bei einer systemischen Applikation keinerlei toxische Effekte ausübt^{94,95}. Aufgrund dieser Selektivität kam es zur vielversprechenden Entwicklung von rekombinantem Trail sowie agonistischer TRAIL-R1/-R2-spezifischer Antikörper⁹⁴⁻⁹⁶. Diese galten als herausragender Therapieansatz, da dadurch in der Theorie maligne Zellen - hierunter auch solche mit vorliegender p53-Mutation - dem programmierten Zelltod zugeführt werden ohne weitere systemische Toxizität auszulösen, wie es für andere Todesliganden (z.B. CD95L, TNF- α) bekannt ist⁹⁷. Problematisch wurde dabei jedoch die Tatsache, dass zahlreiche Tumorzellen Resistenzen gegenüber TRAIL entwickelten^{98,99}. Diese Resistenzlage führt nicht nur zu einer generellen Unwirksamkeit der eingesetzten Therapie sondern über die vermehrte Aktivierung nicht-apoptotischer, proinflammatorischer sowie invasionsfördernder Signalwege sogar zu einer Progression von Zellentartung^{56,100}. Dennoch scheint dieser therapeutische Ansatz nach wie vor sinnvoll, da sowohl TRAIL-Rezeptoren in entarteten Geweben vermehrt exprimiert werden und somit von Vorteil für die Tumorzellen zu sein scheinen als auch deren vermehrte Expression mit einer schlechteren Prognose einhergeht¹⁰¹. Das gezielte Einleiten der Apoptose stellt zudem eine Möglichkeit dar, nicht nur den Progress aufzuhalten, sondern die Krebserkrankung zu heilen. Hieraus leitet sich die Notwendigkeit ab, die weitreichenden Funktionen von TRAIL und dessen Rezeptoren besser zu verstehen, um eine gezielte und erfolgversprechende Therapiemethode entwickeln zu können.

1.9 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

Die bisher beschriebenen weitreichenden Funktionen von WT p53 sowie die teils noch nicht genau verstandenen, deutlich gegensätzlichen, zellkompartimentabhängigen Funktionen der TRAIL-Rezeptoren bieten ein interessantes Feld für die Erforschung komplexer Tumorbiologie. Mehrere im Vorwege dargestellte Überschneidungspunkte zwischen WT p53 und TRAIL-R2 deuten darauf hin, dass sich diese beiden zentralen Regulatorproteine auf unterschiedlichen Wegen beeinflussen könnten. So wird angenommen, dass durch antitumorale Behandlungen aktiviertes WT p53 als transkriptioneller Regulator zu einer erhöhten Menge an plasmamembrangebundenem und nukleärem TRAIL-R2 führt. In vielen Krebsentitäten ist der TRAIL-R2 bereits hochreguliert, sodass eine antitumorale Therapie über eine Aktivierung von p53 zu einer weiteren Steigerung des TRAIL-R2 führt. Zudem gibt es Hinweise durch eigene Vorarbeiten, dass p53 und TRAIL-R2 im Zellkern aneinander gebunden vorliegen. Ihre Wechselbeziehung wird durch eine jeweilige Interaktion mit Proteinen des Mikroprozessorkomplexes als miRNA-Regulatoren zusätzlich erweitert. Wie bereits dargestellt, haben sowohl WT p53 als auch TRAIL-R2 jeweils für sich genommen eine entscheidende Bedeutung in der Tumorbiologie. Zusammengenommen ist umso bedeutender herauszufinden, inwieweit sich diese einzelnen Funktionen blockieren oder unterstützen können. Durch Untersuchungen soll das Verständnis der Pathophysiologie der Tumorentstehung als auch -progression erweitert werden und eine Möglichkeit bieten, zur Entwicklung neuer Strategien in der onkologischen Therapie beizutragen.

Im Rahmen der folgenden Arbeit werden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Wie ist die intrazelluläre Distribution von p53 und TRAIL-R2? Gibt es eine nukleäre Kollokalisierung der beiden Proteine?
- Beeinflusst der TRAIL-R2 p53 in seinen Funktionen als Transkriptionsfaktor und wirkt sich dadurch indirekt auf dessen regulierte Signalwege und Zielproteine aus?
- Inwieweit beeinflusst der TRAIL-R2 p53 in seinen Funktionen als Regulator von micro-RNA

Material und Methoden

2.1 Material

Im Folgenden werden sämtliche verwendete Zelllinien, Lösungen, Puffer, Kits, Antikörper, Gerätschaften sowie übrige Materialien aufgelistet.

2.1.1 Zelllinien

Tabelle 2: Verwendete Zelllinie

Zelllinie	Ursprung	Erstbeschreiber
HCT116 p53+/ HCT116 p53-/-	Immortalisierte humane Tumorzellen des kolorektalen Karzinoms (p53-knockout-Zellen durch Mutagenese generiert)	Brattain et al. ¹⁰²

Anmerkung 1: Die Zellen HCT 116 p53 +/+ sowie HCT 116 p53 -/- wurden uns freundlicherweise von der Universität Hamburg zur Verfügung gestellt

2.1.2 Lösungen und Puffer

Puffer, die für die Zellyse verwendet wurden, enthalten jeweils einen Zusatz eines Protease¹- sowie Phosphatase²-Inhibitors (s. Tab. 12), um einen Protein¹- und Phosphatase²-Abbau zu verhindern.

Tabelle 3: Zusammensetzung sämtlicher verwendeter Lösungen und Puffer

Puffername	Zusammensetzung
Anodenpuffer 1-fach (NativePAGE™ Running Buffer)	50 mM BisTris 50 mM Tricine pH 6.8
Blotting-Puffer 1-fach	192 mM Glycin
	20 % v/v Methanol
	25 mM TRIS Base
EMSA-I-Puffer	1 mM DTT
	0,2 mM EDTA
	10 mM HEPES pH 7,9
	10 mM KCl
EMSA-II-Puffer	0,2 mM EDTA
	04 M NaCl
	10 mM HEPES pH 7,9

Immunpräzipitations-Lysis-Puffer (für Ganzzelllysate)	10 % v/v Glycerol
	120 mM NaCl
	30 mM TRIS Base pH 7,4
	1 % v/v Triton X-100
Immunpräzipitations-Lysis-Puffer (für Kernextrakte)	1 % v/v Glycerol
	120 mM NaCl
	0,5 % v/v NP-40
	30 mM TRIS Base pH 7,4
Kathodenpuffer 1-fach	5 % v/v NativePAGE Running Buffer (20X)
	5 % v/v NativePAGE Cathode Buffer Additive (20X)
Kristallviolett-Lösung	0,5 % v/v Kristallviolett
	20 % Methanol
Kulturmedium	RPMI 1640 Medium
	10 % FCS
	1 % v/v Natriumpyruvat
	1 % v/v Glutamax
SDS-Page-/Laufpuffer 1-fach	192 mM Glycin
	1 % m/v SDS
	TRIS Base pH 7,4
Lämmli-Probenpuffer 4-fach	0,05 % v/v Bromphenolblau
	200 mM DTT
	20 % m/v Glycerol
	S8 % m/v DS
	T250 mM RIS HCl pH 6,8
Native-Lyse-Puffer	1 % m/v Digitonin
	1 % v/v NativePAGE™ Sample Buffer
NativePAGE™ Sample Buffer	50 mM BisTris
	6 N HCl
	50 mM NaCl
	10% m/v Glycerol
	0.001% Ponceau S
	pH 7.2
Polysomenpuffer NP40 0,5%	10 mM HEPES pH 7
	150 mM KCl
	5 mM MgCl ₂
	0,5 % m/v NP-40
RIPA-Puffer	150 mM NaCl
	1 % m/v Natrium-Desoxycholat
	1 % m/v NP-40
	0,1 % m/v SDS
	50 mM TRIS Base pH 7,4

TBS 1-fach	140 mM NaCl
	20 mM TRIS Base pH 7,4
TBS-T 1-fach	1 M NaCl
	100 mM TRIS Base pH 7,4
	10 % m/v Tween 20

2.1.3 Kits

Tabelle 4: Verwendete Kits mit Herstellerangaben

Bezeichnung	Hersteller
mirVana miRNA Isolation Kit	Ambion, Life Technologies, Darmstadt
High Pure miRNA Isolation Kit 2x50 Best	Sigma-Aldrich, Steinheim
TransAM® p53 DNA-binding ELISA for activated p53 tumor suppressor	Active Motif Europe, Belgien
DC Protein Assay Kit II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Pierce BCA Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
DNA/RNA purification Nucleo- Bond PC500 EF	Macherey-Nagel, Düren
Dual Luziferase Reporter Assay System	Promega GmbH, USA
MycoTrace Mykoplasmen Test Kit	PAA Laboratories GmbH, Pasching

2.1.4 siRNA

Tabelle 5: siRNAs mit Herstellernachweis

siRNA	Hersteller	Artikelnummer
Ksi (siRNA Kontrolle, On- Targetplus® non-targeting pool)	GE, Healthcare Europe	D-001810-10
R1si (On-Targetplus® smart pool siRNAs, TNFRSF10A)	GE, Healthcare Europe	L-008090-00
R2si (On-Targetplus® smart pool siRNAs, TNFRSF10B)	GE, Healthcare Europe	L-004448-00
Ksi (Silencer®Select siRNA Nega- tive Control No.1)	Life Technologies GmbH, USA	4390843
R1si (Silencer®Select siRNA TNFRSF10A)	Life Technologies GmbH, USA	4390824
R2si (Silencer®Select siRNA TNFRSF10B)	Life Technologies GmbH, USA	4390825

2.1.5 Plasmide

Tabelle 6: Verwendete Plasmide für die Luziferase-Assays

Bezeichnung	Beschreibung
pRL-TK	Renilla Kontrollvektor
p169	pGL3 – Kontrollvektor
p717	gesamter Promotor der miRNA200c, keine p53-Bindungsstelle
p736	„Enhancer“ für ZEB-1 des Promotors der mi-RNA200c entfernt, keine p53-Bindungsstelle
F1p717	gesamter Promotor der miRNA200c, p53-Bindungsstelle vorhanden
F4p717	gesamter Promotor der miRNA200c, keine p53-Bindungsstelle
F1p736	Beide „Enhancer“ für ZEB-1 des Promotors der mi-RNA200c entfernt p53-Bindungsstelle vorhanden
F1p736	Beide „Enhancer“ für ZEB-1 des Promotors der mi-RNA200c entfernt, keine p53-Bindungsstelle
p342	Promotorsequenz für p21 ^{Waf1} -Gene mit belassenen p53-Bindungsstellen
p344	Promotorsequenz für p21 ^{Waf1} -Gene, erste p53-Bindungsstelle entfernt
p345	Promotorsequenz für p21 ^{Waf1} -Gene, zweite p21-Bindungsstelle entfernt
p346	Promotorsequenz für p21 ^{Waf1} -Gene, mit entfernten p53-Bindungsstellen entfernt

Anmerkung 2: Die Plasmide wurden freundlicherweise von dem Labor für Molekulare Medizin - Experimentelle Medizin I an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (Leiter: Prof. Dr. Thomas Brabletz) sowie von dem Labor für Molekulare Gastroenterologie - Klinik für Innere Medizin I am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel (Leiter: Prof. Dr. Heiner Schäfer) her- sowie zur Verfügung gestellt; Abb. im Ergebnisteil

2.1.6 Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper für Western Blot Analysen sowie Immunpräzipitationen

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Anti-BAX	Maus	Western Blot, Immunpräzipitation 1:250 - 1:500	BD Transduction Laboratories, USA
Anti-β-Aktin	Maus	Western Blot 1:50000	Sigma Aldrich, Steinheim
Anti-E-Cadherin	Maus	Western Blot 1:2500	BD Bioscience, Heidelberg

Anti-MDM2	Maus	Western Blot 1:500 - 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Anti-p21 (Waf1/Cip1)	Maus	Western Blot 1:1000	Cell Signaling Technology, Frankfurt (am Main)
Anti-p53 (DO_1)	Maus	Western Blot, Immunpräzipitation 1:500 - 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-p53	Maus	Western Blot 1:5000	Merck Millipore, Darmstadt
Anti-p3 (FL-393)	Kaninchen	Western Blot, Immunpräzipitation 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-TRAIL-R1	Kaninchen	Western Blot 1:5000 - 1:6000	Merck Millipore, Darmstadt
Anti-TRAIL-R2	Kaninchen	Western Blot 1:4000 - 1:10000	ProSci Inc., Poway, Ettingen
Anti-ZEB1	Kaninchen	Western Blot 1:2500	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tabelle 8: Verwendete Antikörper für Western Blot Analysen

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	Ziege	1:3000 - 1:12000	Cell Signaling Technology, Frankfurt (am Main)
Anti-Maus-IgG, HRP-gekoppelt	Pferd	1:3000 - 1:6000	Cell Signaling Technology, Frankfurt (am Main)

Tabelle 9: Verwendete Antikörper für Immunpräzipitationen, Immunfluoreszenzfärbungen, Imagestreamfärbungen sowie Luziferase-Assays mit Herstellernachweis

Antikörper	Antigen	Hersteller
HGS-ETR1 (Mapatumumab)	TRAIL-R1	Human Genome Science Inc., Düsseldorf
HGS-ETR2 (Lexatumumab)	TRAIL-R2	Human Genome Science Inc., Düsseldorf
Hs101	TRAIL-R1	Alexis Biochemicals, Grünberg
Hs201	TRAIL-R2	Alexis Biochemicals, Grünberg
Maus IgG1	Murine Isotypkontrolle	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle 10: Verwendete Antikörper für Immunfluoreszenz und Imagestreamfärbungen mit Herstellernachweis

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Alexa-Fluor 546 anti-human IgG	Ziege	1:200	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa-Fluor 488 anti-mouse IgG	Ziege	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa-Fluor 488 anti-rabbit IgG	Ziege	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 11: Spektrale Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Farbe
Alexa-Fluor 546	556 nm	573 nm	Rot
Alexa-Fluor 488	495 nm	519 nm	Grün
Hoechst 33342	350 nm	461 nm	Blau

2.1.7 Chemikalien

Tabelle 12: Verwendete Chemikalien mit Herstellernachweis

Chemikalien	Bezogen von
Accutase	Merck Millipore, Darmstadt
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Complete (Protease Inhibitor Cocktail Tablets)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Complete Mini (Protease Inhibitor Cocktail Tablets)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Curix 60 Developer G153 A und B	Agfa, Bonn
Curix 60 Rapid Fixer G354	Agfa, Bonn
DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, München
DharmaFECT 1 siRNA Transfection Reagenz	Thermo Fisher Scientific, Bonn

DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) 1-fach	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) 10-fach	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
DTT \geq 99 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, Freiburg
ECL select	GE Healthcare, Freiburg
ECL plus	Thermo Scientific, Schwerte
EDTA \geq 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol $>$ 99 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
GlutaMAX 100x	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
Glycerol \geq 99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin \geq 99 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hepes Buffer 1M	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hoechst	Sigma-Aldrich, Steinheim
Igepal CA 360 (Nonidet P40)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Otto Fischar GmbH, Saarbrücken
Kaliumchlorid (KCl)	Merck Millipore, Darmstadt
Kristallviolett	Merck Millipore, Darmstadt
Lipofectamine 2000 (1 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma Aldrich, Steinheim
Methanol \geq 99,9 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker, Griesheim
Natrium-Deoxycholat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
OptiMEM Kulturmedium	Invitrogen, Karlsruhe
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Protein G Sepharose Beads 4 Fast Flow	GE Healthcare, Freiburg
Proteinmarker (Spectra Multicolor)	Thermo Scientific, Schwerte
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
RPMI 1640 Kulturmedium	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	J.T. Baker, Griesheim
SDS	Merck Millipore, Darmstadt
TRIS Base	Merck Millipore, Darmstadt
Triton X-100	Merck Millipore, Darmstadt
Trypsin EDTA 10-fach	GE Healthcare, Freiburg
Tween 20	Merck Millipore, Darmstadt

2.1.8 Geräte

Tabelle 13: verwendete Geräte mit Herstellerangabe

Geräte	Nähere Bezeichnung	Hersteller
8-Kanal-Pipette	3000 µl	Eppendorf, Hamburg
Abzug	Medizinbox MB85	Berner International, Elmshorn
Analysenwaage	BP310S	Satorius, Göttingen
Aquadest Anlage	MILLI-Q Reagent water system	Merck Millipore, Darmstadt
Autoklav	CS-Labor 91782	Webeco, Selmsdorf
Blottingkammer	Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., München
CO ₂ -Inkubator	Hera Cell 150i	Thermo Scientific, Waltham, USA
Dounce Homogenisator	Tissue Grind Tube and Pestle SC (2 ml/7 ml)	Gerresheimer, Vineland, USA
Einfrierbehälter	Nalgene "Mr. Frosty"	Thermo Scientific, Schwerte
Einkanalpipetten Eppendorf Research	2,5 µl/10 µl/20 µl/100 µl/200 µl/1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Eismaschine	AF 200	Scotsman, Milan, Italien
Elektrophoresekammer	Novex MiniCell + XCell SureLock	Life Technologies, Darmstadt
Hypercassette	RPN 11642	GE Healthcare, Freiburg
Imaging Flow Cytometer	Amnis ImageStream [®] X MK II	Luminex, Austin, USA
Inkubator 60°C	Typ B6	Heraeus Instruments, Hanau
Kühlzentrifuge	5415R, Rotor: F-45-24-11	Eppendorf, Hamburg
Laborschüttler	TH30, SM-30 Control	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Laborschüttler	Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
Konfokalmikroskop	Zeiss LSM 510	Carl Zeiss, Jena, Germany
Magnetrührer	MR3001	Heidolph, Schwabach
Mikroskop	ID03	Carl Zeiss AG, Oberkochen
pH-Meter	Inolab pH-Level1	WTW GmbH, Weilheim
Photometer	Sunrise Remote Touch screen	Tecan Trading AG, Männedorf
Pipetboy	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Roller	Mixer SRT6, Mixer SRT9	Stuart, Staffordshire, UK

Roller	RM5	Assistent, Altnau TG, Schweiz
Röntgenfilm-Entwickler	Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien
Spektralphotometer	Nanodrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific, USA
Sonifizierer	PG1029	MSE Scientific Instruments, London, UK
Stepper	Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank	LaminAir HB 24724, Heraeus Safe HS12	Heraeus Instruments, Hanau
Thermoblock	Thermomixer Kompakt 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Personal Cyler	Biometra GmbH, Göttingen
Tischzentrifuge	Benchtop Centrifuge Mini Spin Plus, Rotor: F-45-12-11	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Biofuge Stratos Zentrifuge	Heraeus Instruments, Hanau
Tube Rotator	543050	Gerlinde Kisker, Mühlhausen
Vortex Mixer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad		GFL mbH, Burgwedel
Zählkammer		Neubauer Improved, Roth, Karlsruhe
Zellzähler	Cellometer Auto T4	Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA
Zentrifuge	Rotina 48R, Rotor 4394	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

2.1.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 14: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangabe

Verbrauchsmaterialien	Nähere Bezeichnung	Hersteller
Combitips	1,5 ml/5 ml/10 ml	Eppendorf, Hamburg
ECL-Chemiluminiszenz-Film	Hyperfilm	GE Healthcare, Freiburg
Falkon-Röhrchen	15 ml/50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturflasche	T25 (25 cm ²)/T75 (75 cm ²)/T175 (175 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturplatte	6-Well/12-Well	Sarstedt, Nümbrecht
Kanüle	Microlance 3 26G	Becton Dickinson, Heidelberg
Kapillarspitzen	200 µl	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Microloader Pipettenspitzen	0,5 – 20 µl	Eppendorf, Hamburg

Microtiterplatte 96-Well	96-Well	Sarstedt, Nümbrecht
NativePAGE Novex 4-16% Bis-Tris-Gel	1 mm x 10 Well/ 1 mm x 15 Well	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Nitril-Handschuhe	Nitratex Microtouch	Ansell, München
Nunc Rundbodenröhrchen	1,8 ml weiß	Sarstedt, Nümbrecht
Parafilm M		Brand, Wertheim
Pasteurpipette	230 mm	Hecht-Assistant, Sondheim
Petrischale	150 mm x 20 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	20 µl/200 µl/1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF-Membran	Immobilon-P 0,45 µm	Merck Millipore, Darmstadt
Reaktionsgefäße	0,5 ml/1,5 ml/2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten	5 ml/10 ml/25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spritze	1 ml/50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter	0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht
Western Blot Chromatographiepapier	Whatman 3 mm	GE Healthcare, Freiburg
Zellschaber	16 cm/25 cm/39 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellzähl-Slides	SD100	Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA
Zentrifugenröhrchen	7 mm x 20 mm/ 11 mm x 60 mm/ 16 mm x 102 mm	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld

2.2 Methoden

2.2.1 Langzeitlagerung der Zellen

Die verwendeten Zellen wurden in mit 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) versetztem Kulturmedium FCS (fetal calf serum) bei -196°C in Flüssigstickstoff kryokonserviert und aufbewahrt.

2.2.2 Zellkultur

Sämtliche zellbiologischen Handhabungen fanden unter einer Sterilbank statt, um eine Kontamination der Zellen zu verhindern. Die in jeweils 1,8 ml Nunc-Röhrchen aliquotierten, eingefrorenen Zellen wurden aus dem Flüssigstickstoff geholt und im 37°C warmen Wasserbad kurz angetaut. Anschließend wurden diese in ein mit 10 ml vorgewärmten Kulturmedium befülltes Zentrifugenröhrchen überführt und 4 min bei 1440 rpm zentrifugiert, sodass sich ein Zellpellet am Boden absetzte. Der flüssige Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das übrig gebliebene Zellpellet mit 15 ml vorgewärmten Kulturmedium erneut aufgenommen und in eine Gewebekulturflasche (T75) überführt. Daraufhin wurden die gefertigten Zellen im Inkubator bei 37°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 % sowie einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert. Die verwendeten Zellen wuchsen adhärent als Monolayer und wurden regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. So konnte ein Passagieren der Zellen zwei- bis dreimal wöchentlich erfolgen, sobald eine Zellkonfluenz von 80-90 % zu verzeichnen war. Das Teilen der Zellen erfolgte zuerst durch Absaugen des verbrauchten Kulturmediums sowie dem vorsichtigen Waschen der Zellkulturen mit vorgewärmten PBS (*phosphat buffered saline*). Hiernach wurden die Zellen enzymatisch durch Zugabe von 5 ml Trypsinlösung abgelöst. Trypsin gehört zu den Peptidasen und bewirkt durch Spaltung von Adhäsionsmolekülen ein Ablösen der Zellen vom Boden und voneinander, dass sich durch leichtes Beklopfen der Kulturflaschen unterstützen und unter dem Mikroskop optisch überprüfen ließ. Um die Reaktion des Trypsins zu stoppen, erfolgte eine Verdünnung durch Hinzugabe von Kulturmedium. Nachdem die Zellen resuspendiert und in Falcons überführt wurden, fand ein erneutes Zentrifugieren bei 1440 rpm für 4 min statt. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert. Das Aussäen der HCT 116-Zellen erfolgte in einem Teilungsverhältnis von 1:4 – 1:5 auf neue Kulturflaschen. Für anstehende Versuche wurden die Zellen gezählt (s.u.) sowie jeweiligen Versuchsanforderungen angepasst ausgesät.

2.2.3 Zellzählung

Um eine genaue Lebendzellzahl für die je nach Fragestellung verschiedenen Versuchsaufbauten zu gewährleisten, wurden 20 µl der im vorherigen Abschnitt genannten, im letzten Schritt entstandenen Zellsuspension abgenommen und folgend mit dem „Nexcelom Zählsystem“ ausgezählt. Beurteilt und mit einbezogen wurde die Zellvitalität durch das Programm hierbei je nach Zellsymmetrie und -größe. Es wurde ein Mittelwert aus 3 Messwerten errechnet, welcher als Durchschnittswert in Zellzahl/ml angegeben wurde. Bei einer zu großen Abweichung (>10 %) der einzelnen Messwerte wurde eine neue Zählung durchgeführt. Je nach unterschiedlicher Versuchsanforderung und damit einhergehender gewünschter Zelldichte, erfolgte die Aussaat in 6-, 12- oder 96-Loch-Platten. Genauere Angaben als auch das spezifische Vorgehen hierzu finden sich bei den jeweiligen Versuchsbeschreibungen.

2.2.4 Herstellung von Ganzzelllysaten mit RIPA-Puffer

Um die Gesamtproteinfraktion der Zelle zu erhalten, wurden die Zellen mittels RIPA-Puffer lysiert. Die hierfür verwendeten Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät. Nachdem das Kulturmedium abgesaugt wurde, wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml eiskaltem PBS gewaschen. Das Volumen des im Anschluss hinzugegebenen eiskalten RIPA-Puffers, der zusätzlich mit Protease- und Phosphataseinhibitoren versetzt wurde, war abhängig von der Zellkonfluenz und betrug zwischen 100 – 180 µl Pufferlösung pro Well. Die Platten wurden für eine ausreichende Zellyse daraufhin zuerst für 10 min auf Eis gelagert, dann für mind. 20 min bei -80°C eingefroren und wieder auf Eis aufgetaut. Es folgte ein Abschaben der Zellysate, deren anschließendes Pipettieren in 1,5 ml große Reaktionsgefäße und Sonifizieren für jeweils 10 sec. Dies gehört zu den mechanischen Aufschlussverfahren und bedingt durch rasche Druckänderungen ein Aufbrechen der Zellen sowie die Fragmentierung der enthaltenen DNA. Da unter dieser Methode viel Wärme frei wird, sollten nur kurze Intervalle durchgeführt werden. Auf diesen Schritt folgte ein 15-minütiges Zentrifugieren bei 4°C mit 13.600 rpm. Der entstandene Überstand entsprach dem fertigen Lysat und wurde in eine neues Reagiergefäß. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels BCA-Proteinassay (s.u.). Die Zellysate wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5 Herstellung von Ganzzelllysaten mit IP-Lysepuffer

Für die Immunpräzipitationen wurden die WT- sowie KO-p53 HCT 116 Zellen auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät und für 48 h inkubiert. Für das Erstellen der notwendigen Proteinmenge waren zwei Petrischalen pro Probe notwendig. Die Platten wurden auf Eis gestellt und die Zellen je nach Konfluenz (60-80 %) mit 2 - 4 ml IP-Lysis-Puffer benetzt, abgeschabt und die Zellsuspension für 20 min auf Eis inkubiert. Ob die Zellen von den Platten gelöst waren, wurde mittels Mikroskopie überprüft. Die Proben wurden nach Ablauf der Inkubationszeit in 2 ml Eppendorf-Reagiergefäße pipettiert, erst für 5 min bei 5.000 Umdrehungen pro Minuten und direkt darauf 30 min bei 13.200 rpm sowie 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden zusammengefügt und auf neue Reagiergefäße aufgeteilt. Darauf erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels DC-Proteinassay (s.u.). Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.2.6 Herstellung von Kernlysaten mit EMSA-Puffer

Um zellkompartiment-abhängige Untersuchungen durchzuführen, wurden Lysate erstellt, bei denen die nukleären von den zytoplasmatischen Zellanteilen getrennt wurden. Hierfür erfolgte das Aussäen der Zellen auf 6-Well-Zellkulturplatten. Die Behandlungsdauer gestaltete sich je nach Fragestellung unterschiedlich. Die Lyse wurde eingeleitet, nachdem die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit EMSA-I-Puffer (mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor) versetzt wurden (bei ausreichender Zellkonfluenz 300 µl/Well). Der EMSA-I-Puffer bringt die Zellen durch seine hypotonen Eigenschaften zum Platzen die Zellkerne jedoch intakt bleiben. Es folgte das Überführen der Lysate in 2 ml Reagiergefäße und eine anschließende Inkubation auf Eis für 5 min. Anschließend wurden die Lysate für 5 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand (entspricht der zytoplasmatischen Fraktion) in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Das verbliebene Zellpellet wurde dann mit EMSA I (erneut mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor versetzt) gewaschen und anschließend zentrifugiert (ebenfalls bei 4 °C und 13.000 rpm). Dieser Schritt wurde insgesamt 4 Mal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 40 µl EMSA-II-Puffer (mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor) aufgenommen. Anschließend wurden die Proben 30 min auf Eis geschüttelt und dann 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, entsprechend der nukleären Fraktion, wurde in neue Reagiergefäße überführt und bei -80°C gelagert.

2.2.7 Proteinbestimmungen mittels BCA-Assay

Das Bicinchioninsäure-Assay quantifiziert durch ein kolorimetrisches Nachweisverfahren die Gesamtproteinmenge einer Probe. Zur Durchführung der Bestimmung wurde eine Standardreihe aus BSA versetzt mit dem jeweiligen Puffer, welches bereits für die Herstellung der Zellproben verwendet wurde, erstellt und neben 1:10 verdünnten Ganzzelllysaten auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Durch die Zugabe der Reaktionslösung (Kupfer- und BCA-Reagenz) werden die darin enthaltenen Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reduziert, welche wiederum mit der Bicinchionsäure einen violetten Farbstoffkomplex bilden (Biuret-Reaktion zum Nachweis der Peptidbindungen). Die Intensität der Farbreaktion, die proportionale zu der Proteinmenge ist, wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen.

2.2.8 Proteinbestimmung mittels DC-Assay (nach Lowry)

Für die Immunpräzipitationen aus den IP-Ganzzelllysaten wurde eine Proteinbestimmung dieser Lysate nach Lowry durchgeführt. Bei einem der Biuret-Reaktion entsprechendem ersten Schritt reagieren die Cu^{2+} -Ionen unter violetter Farbumschlag mit den Protein-Peptidbindungen und werden dann zu Cu^+ -Ionen reduziert. In einem zweiten Schritt reduzieren die Kupfer(I)-Ionen ihrerseits das Folin-Ciocalteu-Reagenz (Molybdätophosphorsäure und Wolframatophosphorsäure) zu Molybdänblau. Es kommt zur tiefblauen Färbung, wodurch die Proteinkonzentration mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen werden konnten. Ebenso wie bei dem BCA-Assay wurde eine Standardreihe mituntersucht sowie eine Verdünnung von 1:3 der IP-Zelllysate gewählt.

2.2.9 P53 DNA binding ELISA

Mithilfe des „TransAM® p53 DNA-binding ELISA for activated p53 tumor suppressor-Kit“ kann eine quantitative Bestimmung des Aktivitätsgrades von p53 untersucht werden. Auf eine 96-Well-Mikrotitrierplatte, die mit einem gegen p53 gerichteten Antikörper (Erstantikörper bzw. „*Capture-Antibody*“) beschichtet ist, wurde das zu untersuchenden Kernextrakte gegeben und damit eine Bindung zwischen dem Antikörper und nachzuweisendem Antigen hergestellt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h schloss sich eine Waschphase an, um ungebundene oder unspezifisch gebundene Antigene zu entfernen, die eine falsch positive Reaktion bedingen könnten. Nun erfolgte die Zugabe eines zweiten, ebenfalls gegen p53 gerichteten Antikörpers (Zweitantikörper bzw. „*Detection-Antibody*“). Dieser bindet an ein anderes Epitop des Antigens, damit es zu keiner konkurrierenden Behinderung beider Antikörper in ihrer Bindung

kommt. Entstanden ist durch diese Schritte ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Zudem ist an den Zweitantikörper ein Enzym gebunden, das nach erneuten Waschschritten ein hinzugegebenes Substrat unter einer Farbreaktion umsetzte, sodass die Enzymaktivität photometrisch detektierbar war. Diese Umsetzung gestaltete sich proportional zur Menge des gebundenen p53.

2.2.10 siRNA-Transfektion

Transfektion gehört zu den Mechanismen des Gentransfers und bezeichnet die Aufnahme von freier, „nackter“ DNA oder RNA durch eine eukaryotische Zelle. Hierdurch können genetische Informationen transferiert werden. Es können ein zeitweiliges (transiente Transfektion) oder dauerhaftes Einbringen in das Genom (stabile Transfektion) unterschieden werden. In den vorliegenden Versuchen wurden die WT- und KO-p53 HCT 116 Zellen transient für 24 bis 96 h mit spezifischen siRNAs transfiziert, um die Expression von Trail-R1 oder -R2 herunter zu regulieren. Als Kontrolle wurde eine nicht zielgerichtete Kontroll-siRNA verwendet. Bei den genutzten Produkten handelt es sich um SMARTpool On-Targetplus® und Silencer®Select. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamin 2000 verwendet.

Abhängig von der geplanten Transfektionsdauer, wurden die Zellen zwischen $1,5 \times 10^5$ und 3×10^5 Zellen pro Well in eine 6- oder 12-Well-Platte ausgesät und für 24h inkubiert. Bevor die Transfektion nach Herstellerprotokoll durchgeführt wurde, erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Zellvitalität sowie -konfluenz. Danach erfolgte das Erstellen der siRNA- und Lipofectamin-Ansätze gelöst in OptiMEM-Medium sowie eine Inkubation der Lösungen von 20 min. Das verbrauchte Zellkulturmedium wurde ausgetauscht und die jeweiligen Transfektionsansätze mit einer siRNA-Endkonzentration von 100 nM zu den Zellen gegeben. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des OptiMEM-Mediums wurde dieses geschützt gelagert sowie alle Schritte unter minimaler Beleuchtung durchgeführt. Nach Ablauf der verschiedenen Transfektionszeiten wurden RIPA-Lysate hergestellt und der Erfolg des Rezeptorknockdowns mittels Western-Blot validiert, um die Proben für weitere Versuche eindeutig nutzen zu können.

2.2.11 Plasmid-Transfektion und Dual-Luziferase-Assay

Als Plasmide werden in Bakterien vorkommende, kleine, extrachromosomale, also frei vorliegende Ringe aus doppelsträngiger DNA bezeichnet, welche sich autonom replizieren können. Sie sind entscheidend in der Gentechnik, da sie als Vektoren wie eine „Genfähre“ Fremd-DNA oder -RNA in Empfängerzellen einbringen und vervielfältigen können.

Diese Methode wurde angewandt, um den Einfluss der TRAIL-Rezeptoren auf das Tumorsuppressorprotein p53 auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen. Verwendet wurden in der vorliegenden Arbeit Plasmide mit darin klonierten Promotoren der miRNA200c als auch des Zellzyklusproteins p21 sowie dahinter enthaltener Luziferase. Luziferasen katalysieren die Oxidation von Luziferinen zu energiereichen Dioxetanen. Während dieses Vorgangs kommt es zur Chemilumineszenz, dessen Stärke gemessen werden kann und damit einen Rückschluss auf die jeweilige Genaktivität bzw. umgesetzte Genexpression liefert (s.u.). Es kommen sogenannte Firefly- und Renilla-Luziferasen vor, die sich dahingehend unterscheiden, dass Firefly-Luziferasen ATP für die Reaktion benötigen.

Für den Versuch wurde der Promotor des Gens, dessen Genprodukt analysiert werden sollte, mit einem Firefly-Luziferase-Gen verbunden. Durch diese Kopplung wird, wenn das Promotorgen aktiviert bzw. umgesetzt wird, nun unter Lichtemission D-Luciferin zu Oxyluciferin umgebaut. Die entstandene Chemilumineszenz gestaltet sich in ihrer Stärke proportional zur jeweiligen Promotoraktivität – bei hoher Aktivierung ergab sich ein deutlich stärkeres, bei geringerer demnach ein schwächeres Lichtsignal. Bei diesem Assay handelte es sich um ein sog. Dual-Reporter-Gen-Assay, wobei zwei Reporterenzyme enthalten sind. Das eine Reporterenzym (in diesem Fall die Firefly-Luziferase) dient der spezifischen Lichtumsetzung des Experiments, während der zweite Reporter (in diesem Fall die Renilla-Luziferase) als Kontrolle zur Darstellung der Basalaktivität eingesetzt wird. Beide Reporteraktivitäten werden sodann gegeneinander normalisiert und verringern somit Messschwankungen des Versuchs, welche aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienz entstehen können. Für die Plasmidtransfektionen wurden wie im vorherigen Abschnitt beschrieben HCT 116 p53 +/+ sowie HCT 116 p53 -/- mit siRNA gegen TRAIL-R1 sowie -R2 transfiziert und somit ein Rezeptorknockdown erzielt (s. 2.2.9. „siRNA-Transfektion“). Nach 48 h erfolgte dann eine weitere Transfektion mit je nach Versuch benötigten Plasmiden für die vorhandenen, verschiedenen miRNA200c- oder p21-Promotoren. Hierzu wurden 1 µg des jeweiligen Plasmids und 0,5 µg des Renilla-Reportergens mit OptiMEM-Medium sowie das Transfektionsreagenz Lipofectamin ebenfalls mit OptiMEM-Medium vermischt und für 20 min inkubiert. Der Ansatz mit Lipofectamin wurde jeweils zu einem Plasmidansatz hinzugefügt und nach dem Ablauf der Inkubationszeit zusammen auf die Zellen pipettiert. Die Platten wurden erneut im Inkubator bei 37°C bebrütet. Nach 6 h wurde das Medium gewechselt, 24 h nach der Plasmidtransfektion wurden die Zellen für die

weitere Analyse lysiert. Hierzu wurden die Wells vorsichtig nach Absaugen des Kulturmediums einmalig mit PBS gewaschen sowie anschließend 200 µl des im Kit enthaltenen Passive Lysis Buffers pro Well hinzugegeben. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei -80°C erfolgte das Auftauen der Platten bei RT und anschließende Abkratzen der Zellen mittels Zellschaber. Die Lysate wurden für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in neue Reagiergefäße überführt. Für zeitlich spätere Versuchsabläufe wurden die Proben bei -20°C gelagert. Erfolgte das Assay direkt im Anschluss an die Zelllyse, wurden 20 µl eines jeden Zelllysats mit 100 µl des Luciferase Assay Reagenz (bestehend aus Luziferase Assay Buffer und Substraten) in einer 96-Well-Platte zusammengefügt, wobei jede Probe zweimal aufgetragen wurde, um für die Auswertung einen Mittelwert bestimmen zu können. Die Lichtreaktion der Proben und der entsprechende experimentelle Reporter-Wert wurden jeweils für 10 sec mit dem Luminometer bei einer Verzögerung von 2 sec gemessen. Anschließend kam es zu einer automatischen Injektion eines Stop-and-Glo-Reagenzes zu den Proben mit erneuter 10-sekündiger Messung und 2-sekündiger Verzögerung. Dieser Schritt erbrachte den Aktivitätswert des Kontroll-Reporters.

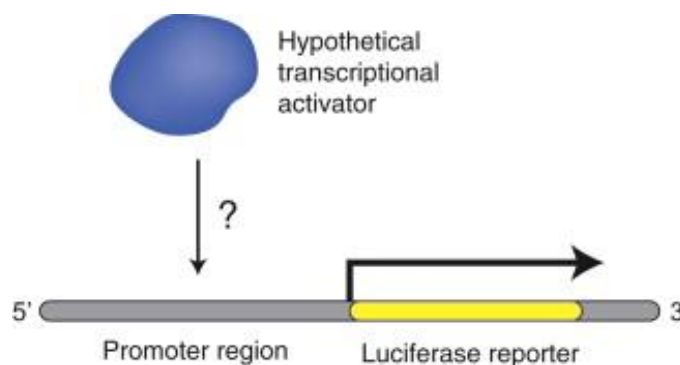


Abbildung 10: Schematische Darstellung eines Luciferase Assays (Methods in enzymology, Sciencedirect 2004).

2.2.12 Immunfluoreszenzfärbung

Bei der Immunfluoreszenz handelt es sich um eine immunhistochemische Methode, bei der fluoreszenzmarkierte Antikörper Antigene sichtbar machen können. Man unterscheidet eine direkte von einer indirekten Form. Bei der in der vorliegenden Arbeit genutzten indirekten Form erfolgt die Färbung in zwei Schritten: hierbei werden beginnend die Zellen mit einem nicht-fluoreszenzmarkierten Primärantikörper, der sich gegen das zu untersuchende Protein richtet, inkubiert. Ein zweiter, nun Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper, wird auf die

Probe aufgebracht und bindet spezifisch an den ersten Antikörper. So bindet dieser Sekundärantikörper indirekt an das Zielprotein, wenn es eine Bindung zwischen diesem und dem Primärantikörper gegeben hat. Für eine Negativkontrolle wurde der erste Antikörper weggelassen, um eine unspezifische Bindung seitens des Sekundärantikörpers, wenn vorhanden, zu erfassen. Die Analysierung der Färbung kann dann z.B. mit einem konfokalen Lasermikroskop erfolgen, wobei der Laser die Fluoreszenz der gefärbten Zellen bei Auftreffen auf diese anregt. Hier wurde diese Methode gewählt, um nachzuweisen, wo sich die zu untersuchenden Zielproteine in der Zelle befinden und ob es eine mögliche Kolo-kalisation dieser untereinander gibt.

Für die Immunfluoreszenzversuche wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Loch einer 6-Well-Platte auf ein Deckgläschen ausgesät. Nach 40 h wurde das Medium entfernt und die Zellen nach viermaligem Waschen mit eiskaltem PBS auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min in 1 ml eiskaltem 2,5-prozentigem PFA/TBS geschwenkt, dann zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation 1 ml -20°C -kaltem Methanol für 10 min und ein anschließendes, zweimaliges Waschen mit kaltem PBS für jeweils 5 min. Diese Schritte erfolgten, um die Zellen zu fixieren. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen für 15 min in 1 ml 0,5 % BSA/TBS bei RT gelegt.

Der Primärantikörper wurde in 0,5 % BSA/TBS angesetzt, wovon dann je 70 μl auf ein glatt gestrichenes Stück Parafilm in einer feuchten Kammer pipettiert wurde. Das darauf zu legende Deckgläschen wurde so platziert, dass die Zellseite nach unten zeigte. Es folgte eine Inkubation von 2 h bei RT sowie ein anschließendes Waschen der Deckgläschen mit TBS einmal für 15 min und dreimal für je 5 min. Um die Zellen zu färben, wurde der Hoechst-Farbstoff hinzugegeben. Die Inkubation mit dem Fluorochrome-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte dann für 1 h bei RT im Dunkeln. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Deckgläschen erneut einmal für 15 min, dreimal für je 5 min in TBS und 1 min in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen auf einen Objektträger mit einem Tropfen Mounting-Medium gelegt. Um das Austrocknen der Zellen zu verhindern, wurden die Deckgläschen mit Nagellack umrandend bestrichen. Daraufhin konnte die Färbung mittels o.g. konfokaler Laser Scanning Mikroskopie ausgewertet werden.

2.2.13 Imaging Flow Cytometry

Bei der Imaging Flow Cytometry handelt es sich um eine Kombination aus Durchflusszytometrie sowie Fluoreszenzmikroskopie. Die Durchflusszytometrie erlaubt eine morphometrische Einteilung der Zellen nach Größe und Komplexität, entsprechend dem entsandten Streulicht, das von den vom Laser beleuchteten Zellen ausgeht. Durch die Verwendung von Fluoreszenzmikroskopie kann mit farbstoffmarkierten Antikörpern zusätzlich eine Detektion und Sortierung der Zellen nach Zielproteinen stattfinden, gegen die sich diese verwendeten Antikörper richten. So erlaubt die Methode eine quantitative, aber auch bildgebende Darstellung über mögliche Interaktionen und Kollokalisierungen der Zielproteine. In Zusammenarbeit mit Dr. Jürgen Fritsch (Institut für Immunologie, CAU Kiel) wurde das ImageStream von Amnis® ImageStream^X MK II (Luminex) verwendet. Für den Versuchsablauf wurden die Zellen ausgesät und 48 h später mit 5 ml Accutase™ abgelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Der weitere Versuchsablauf entspricht dem der Immunfluoreszenz (s.o.), wobei jedoch alle Schritte in FACS-Röhrchen und nicht auf Deckgläsern durchgeführt wurden. Die letzten Schritte unterscheiden sich zudem darin, dass nach Hinzugabe des Hoechst-Farbstoffes eine Inkubation von 10 min sowie dann eine Vermengung mit 1 ml TBS erfolgten. Anschließend wurden die Suspensionen herunter zentrifugiert und zweimal mit 1 ml TBS gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation erfolgte das Wiederaufnehmen des Zellpellets in 30 µl TBS und daraufhin die Analyse mittels Imaging Flow Cytometry.

2.2.14 Immunpräzipitation

Immunpräzipitation ist eine molekularbiochemische Methode, um ein spezifisches Protein zu isolieren, indem man sich das Ausfällen von Antigen-Antikörper-Komplexen zu Nutze macht. Bei Bindung zwischen Antikörpern und Antigenen bilden sich Immunkomplexe. Liegen Antigene im Überschuss vor, werden alle Antikörperbindungsstellen besetzt, es kommt zur Bildung löslicher Immunkomplexe. Liegen Antikörper im Überschuss vor, werden alle Antigenbindungsstellen besetzt und es kommt auch hier zur Bildung löslicher Immunkomplexe. Liegen nun gleiche Mengen an Antigenen und Antikörpern vor, bildet sich ein großer, schwer löslicher Immunkomplex, welcher ausfällt. So kann mittels Immunpräzipitation ein gesuchtes Antigen, sofern vorhanden, mittels eines spezifischen Antikörpers ausgefällt werden. Weitere, an das zu präzipitierende Protein gebundene Interaktionspartner, können damit ebenfalls kon-

zentriert werden, was auch als Kopräzipitation bezeichnet wird und den Nachweis von größeren Proteinkomplexen ermöglicht. Um das zu untersuchende Protein überhaupt aus dem Zelllysate zu trennen, werden verschiedene Methoden angewandt, die die Antikörper an eine feste Struktur binden. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Protein-G umzogene Sepharosekügelchen verwendet, auf nur die im Folgenden eingegangen wird. Das Protein G ist Bestandteil der Zellwand von bestimmten Streptokokken-Stämmen und hat die Eigenschaft, den Fc-Teil der meisten Säugetier-Immunglobuline zu binden. Mit diesen Proteinen werden Kügelchen beschichtet (sogenannte Beads, z.B. aus Sepharose), an die die Antigen-Antikörper-Komplexe gebunden und dann aus dem Lysat präzipitiert werden.

Das Erstellen von Ganzzelllysaten für die Immunpräzipitationen sowie die Proteinbestimmung wurden bereits unter den Punkten 2.2.6 und 2.2.8. beschrieben. Für die Versuche wurden dann entweder direkt erstellte oder die bereits im Vorfeld erstellten und gelagerten Lysate verwendet. In einem ersten Schritt fand das sogenannte „Pre-Clearing“ statt, welches dazu dient, Proteine aus dem Lysat, die unspezifisch an die Sepharosebeads binden. Dafür wurden 40 µl der in 20 % Ethanol gelösten Sepharosekügelchen mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in 2 ml Reagiergefäße überführt, bis zu einem Gesamtvolumen von 1,5 ml mit IP-Lysis-Puffer aufgefüllt sowie zuletzt mit den Microloader-Pipettenspitzen nahezu trocken gesogen. Auf diese umgepufferten Beads wurden 1 mg des Ganzzelllysats pro Probe gegeben und die Ansätze für 1 h in einem Reagiergefäß-Rotator bei 4°C gedreht. Nach Ablauf der Zeit wurden die Protein-G-Sepharosekügelchen bei 3.000 rpm für 30 sec in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der gesamte Lysat-Überstand wurde mit den Microloader-Spitzen in neue Gefäße überführt und die Beads des „Pre-Clearing“-Prozesses verworfen. Es folgte das Hinzugeben von 5 – 10 µg des jeweiligen Primärantikörpers zu den vorgereinigten Lysaten. Ebenfalls wurden Kontrollen erstellt, indem gleiche Mengen der verwendeten Primärantikörper in einer äquivalenten Menge IP-Lysis-Puffer und Protein-G-Sepharosekügelchen anstatt des Zelllysates angesetzt wurden. Dies diente der Bestimmung der Antikörperbanden. Zudem wurde eine aus Beads und Zelllysate bestehende Kontrolle hergestellt, die dem Nachweis eventuell weiterhin, trotz pre-clearings bestehender unspezifischer Bindungen zwischen Protein und Sepharosekügelchen diene. Eine letzte Kontrolle enthielt das alleinige Lysate ohne Antikörper und den Beads. Bis auf die Kontrollen wurden alle angesetzten Proben bei 4°C über Nacht im Rotator inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden wie bereits oben beschrieben erneut für jede Probe 40 µl der Protein-G-Sepharose-Beads umgepuffert und die angesetzten Gemische zu

diesen pipettiert. Nach einer 3-stündigen Inkubationszeit (4°C im Tube-Rotator), erfolgte ein Abzentrifugieren der Beads für 30 sec bei 3.000 rpm sowie das 5-malige Waschen mit je 1 ml IP-Lysis-Puffer mithilfe der Microloader-Pipettenspitzen. Die Kügelchen wurden anschließend in 60 µl IP-Puffer und 40 µl 4-fach Laemmli-Puffer aufgenommen und für 10 min bei 80°C im Thermoblock erhitzt. Dadurch wurde erreicht, dass sich die Antikörper-Antigen-Komplexe von den Beads ablösten. Als letzten Schritt wurden die Beads wie vorherig beschrieben abzentrifugiert, der Überstand als fertige Probe mit den Microloader-Pipettenspitzen in neue Röhrchen überführt und diese bis zur Analyse im Western Blot bei -20°C aufbewahrt.

2.2.15 Protein-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Abkürzung SDS-PAGE steht für „*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*“. Diese Methode dient der Auftrennung von Proteinen je nach molekularer Masse durch elektrophoretische Mobilität im elektrischen Feld. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Tensid, welches ein Denaturieren der Proteine bedingt, sich an diese anlagern kann und dadurch die Eigenladung der Proteine überdeckt sowie folglich zu einer konstanten Negativladung dieser führt. Es wird eine elektrische Spannung angelegt, sodass die negativ geladenen Moleküle durch das Polyacrylamidgel zur Anode wandern. Hierbei fungiert das Gel als eine Art Sieb und die Proteine migrieren entsprechend ihrer Größe: kleine Proteine wandern leichter und damit schneller, große Proteine werden in den Gelporen zurückgehalten und kommen daher langsamer voran. Vor dem Auftragen der Proben, wurden die RIPA-Lysate nach der Proteinbestimmung jeweils so angesetzt, dass die Proteinmenge gleich und das Volumen mittels Puffer angeglichen war. Anschließend wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:4 mit 4-fachem Laemmli-Puffer versetzt, zur Denaturierung der Proteine im Thermoblock für 5 bei 95°C erhitzt und anschließend kurz runterzentrifugiert. Für die Gelelektrophorese wurden bereits fertige 4 – 20 %-haltige TRIS-Glycin-Gele verwendet. Die Probenmengen unterschieden sich je nach Versuch und gestalteten sich so, dass zwischen 5 und 20 µg Protein in die Gel-taschen aufgetragen wurden. Zusätzlich wurde ein Komigrationsstandard (auch ugs. Größenmarker) mitlaufen gelassen, um aufgrund der bekannten Molekülgröße dieses Standards einen Größenvergleich der Proteine in der Probe zu ermöglichen. Abschließend wurde eine Spannung von 120 V angelegt und die Elektrophorese für ca. 2 h laufen gelassen.

2.2.16 Western-Blot und Immundetektion

Nach dem Auftrennen der Proteine folgte das Western-Blotting. Dies bezeichnet den ebenfalls unter Anlage eines elektrischen Feldes stattfindenden Transfer der zuvor nach Größe geordneten Proteine auf eine PVDF-Membran. Hierfür wurde eine Blot-Kassette in folgender Reihenfolge bestückt: Anode – Whatman-Paper – Membran – Gel – Whatman-Paper – Kathode (s. Abb. 11). Die PVDF-Membran wurde aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften vor dem Gebrauch für 10 sec in Methanol getaucht, um einen Kontakt mit dem Blottingpuffer zu ermöglichen. Vor dem Einsatz wurde sie kurz mit destilliertem Wasser abgespült. Eventuelle Luftblasen zwischen der Membran und dem Gel, die einen vollständigen Proteintransfer behindern könnten, wurden vorsichtig mithilfe eines 50 ml-Probenröhrchens herausgedrückt. Abgeschlossen wurde die Schichtung mit einem Schwämmchen. Unter Einhaltung der richtigen elektrischen Ausrichtung, wurde die Kassette in eine mit Blotting-Puffer gefüllte Kammer gespannt und eine Stromstärke von 400 mA angeschlossen. Zum Verhindern der entstehenden Hitze während des Vorgangs, wurde die Kammer von Eis umgeben. Nach 2h war der Proteintransfer abgeschlossen. Die Membran wurde kurz in TBS-T gewaschen, sowie erneut für 10 sec in Methanol geschwenkt und für 20 min getrocknet. Anschließend erfolgte der Proteinachweis mithilfe spezifischer Antikörper. Um zuerst freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurden diese je nach Herstellerempfehlung für den im späteren Schritt verwendeten Primärantikörper für 1 h entweder in 5 % Milch/TBS-T oder 5 % BSA/TBS-T gelegt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran in einem 50 ml Falcon mit 3 ml des spezifischen Antikörpers, der selektiv an mit seiner „Antigen-Bindungs-Domäne“ an das passende Epitop des Proteins binden kann, bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden Waschschriffe (3 x 10 min in TBS-T) durchgeführt, um unspezifisch gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Nun wurde mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten sekundären Antikörper, der sich gegen den eingesetzten Primärantikörper richtet, für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend folgten erneute Waschschriffe.

Die Meerrettichperoxidase bewirkt eine Spaltung des Luminols, welches in dem zum optischen Nachweis der Protein-Antikörper-Bindungen verwendeten ECL-Detektionsreagens enthalten ist. Hierbei kommt es zur Emission von Licht emittiert (Chemilumineszenz), welches mittels Röntgen detektiert werden kann. Das Lichtsignal ist proportional zur Proteinmenge.

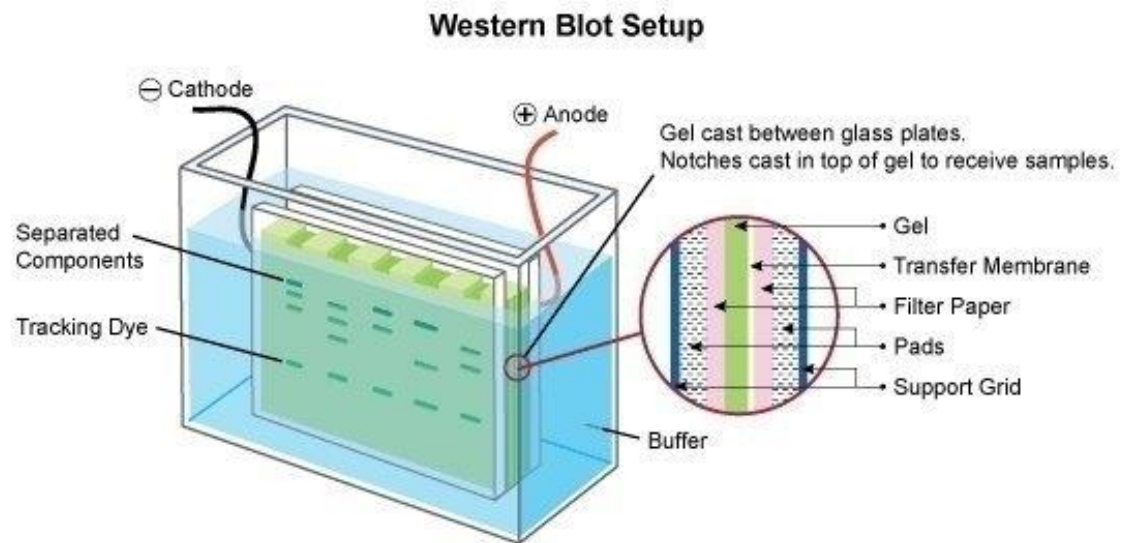


Abbildung 11: Schematischer Aufbau einer Western Blot Kammer (Quelle: <https://www.antibodies-online.com/resources/17/1224/western-blotting-immunoblot-gel-electrophoresis-for-proteins/>)

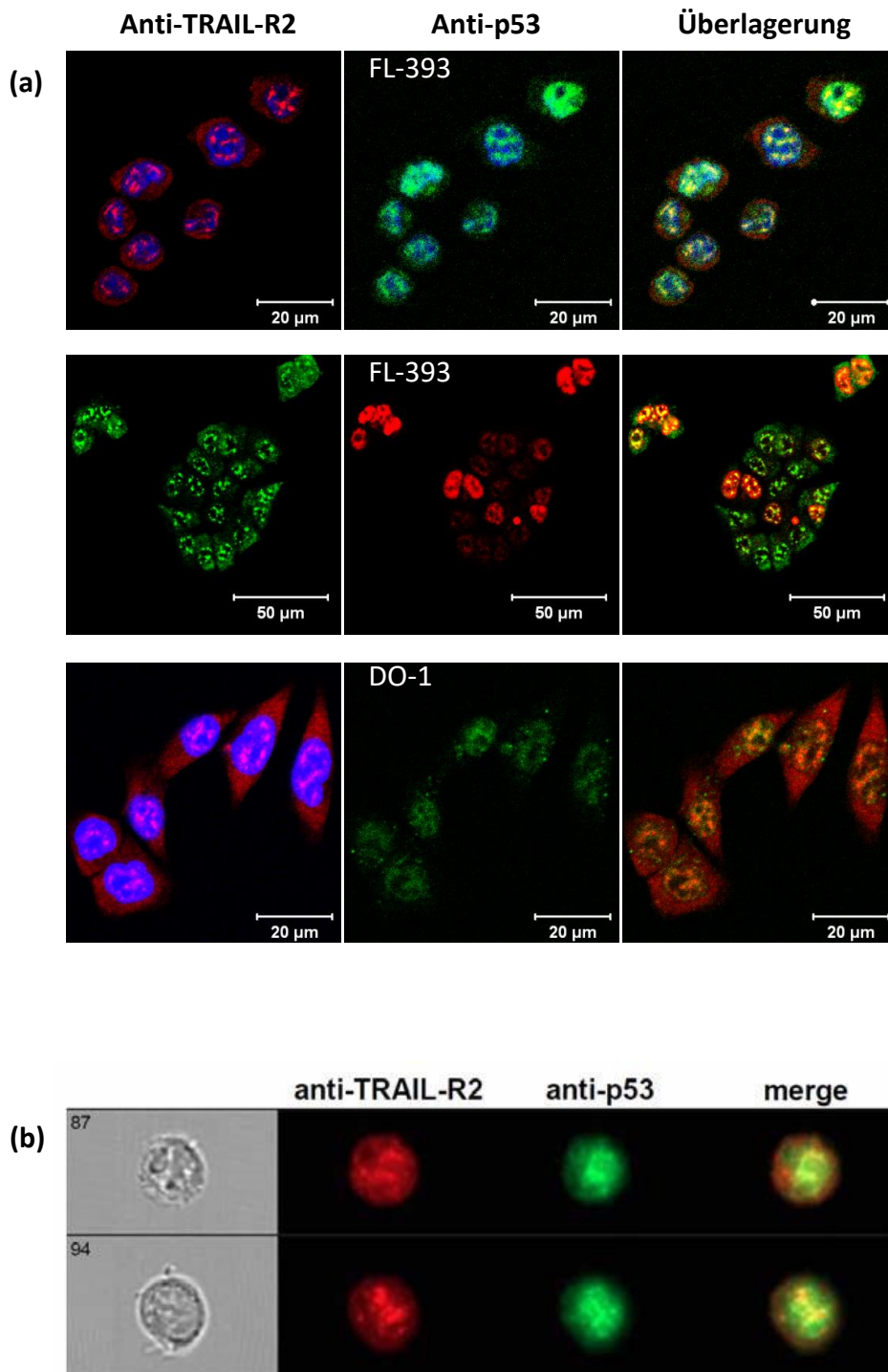
Ergebnisse

Die folgenden Versuche zielen darauf aus, ein genaueres Verständnis bezüglich der Interdependenz zwischen dem Tumorsuppressor p53 und dem TRAIL-R2 zu erlangen. Bekannt ist seit Jahren, dass bei einer durch DNA-Schäden ausgelösten p53-Aktivierung die Expression des TRAIL-R2 hochreguliert wird. Hinzu kommen die Erkenntnisse, dass beide Faktoren im Zellkern mit dem Mikroprozessorkomplex interagieren. Daher ist es von großem Interesse zu erforschen, ob es Einflüsse seitens des TRAIL-R2 auf das Tumorsuppressorprotein p53 sowie dessen induzierte Signalwege gibt und in welchem Maße dies für antitumorale Therapien von Relevanz sein könnte. Für dieses Vorhaben wurden v.a. Immunfluoreszenz, Durchflusszytometrie, Immunpräzipitation und Dual-Luziferase-Reporterassays unter Verwendung der kolorektalen Karzinomzelllinie HCT 116 angewandt. Diese Zelllinie wurde in zwei isogenen Varianten verwendet: die WT-p53-exprimierende Variante HCT116 p53^{+/+} sowie die p53-knock-out-Variante HCT 116 p53^{-/-}, bei der beide Allele inaktiviert wurden.

3.1 Überprüfung der intrazellulären Verteilung von TRAIL-R2 und p53

Aufgrund des intranukleären Nachweises von TRAIL-R2 sowie der beschriebenen funktionellen Überschneidungspunkte, erfolgten Versuche, die dazu dienten, das gemeinsame Vorliegen und damit mögliche, voneinander abhängige Lokalisation von TRAIL-R2 und p53 im Zellkern nachzuweisen. Für die Fragestellung wurde die Immunfluoreszenzfärbung mit anschließender konfokaler Lasermikroskopie (LSM) sowie als zweites Verfahren in Zusammenarbeit mit Dr. Jürgen Fritsch (Institut für Immunologie, CAU Kiel) das Imaging Flow Cytometer (ImageStream[®]) genutzt. Hierfür wurden die HCT116 p53^{+/+} Zellen mit spezifischen primären sowie fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern inkubiert. Anschließend erfolgte die Auswertung mittels der bereits genannten Verfahren. Hierbei gelang der Nachweis einer deutlichen Kolo-kalisation, der durch die gelben Bereiche des Überlagerungsbildes der Einzelbilder ersichtlich wird sowie eine Quantifizierung dieser durch die Hochdurchsatzmikroskopie (Abbildung 12 (a) und (b)). In 62% der untersuchten Zellen konnte unter Verwendung der genannten Methode eine Interaktion der beiden Proteine im Zellkern nachgewiesen werden. Abgebildet ist hier lediglich ein Ausschnitt der Auswertung, da der Umfang der eigentlichen Analyse zur

Abbildung nicht geeignet ist. Um Die Spezifität dieser Ergebnisse zu überprüfen, also mögliche unspezifische Bindungen oder Kreuzreaktionen der Antikörper auszuschließen, wurden jeweils zwei unterschiedliche Antikörper gegen TRAIL-R2 (HS201 und Lexatumumab (Lexa)) und p53 (DO-1 und FL-393) verwendet. Die zuvor aufgezeigte Kolo-kalisation beider Proteine konnte erneut und auch durch den zweiten eingesetzten Antikörper dargestellt werden (Abbildung 12 c). Im Gegensatz dazu konnte keine Interaktion zwischen p53 und Trail-R1 nachgewiesen werden, sodass zur Gegenkontrolle die Zellen mit Antikörper gegen TRAIL-R1 (Mapatumumab (Mapa)) sowie gegen p53 inkubiert und wieder anhand von konfokaler LSM analysiert (Abbildung 13 a) wurden. Zur weiteren Spezifizierung wurden die WT-p53 HCT 116 Zellen ohne primären sondern nur mit sekundären Antikörpern inkubiert. Es konnte keine Zellfärbung nachgewiesen werden (Abbildung 13 b). Zudem wurde untersucht, ob es unspezifische Kreuzreaktionen der p53-Antikörper gab. Unter Kreuzreaktivität versteht man die Eigenschaft von Antikörpern an verschiedene Antigene binden zu können, da diese eine ähnliche oder identische Bindungsstelle besitzen. Daher war es von Bedeutung zu verifizieren, dass der jeweilige Antikörper an sein spezifisches Protein gebunden hat. Hierbei ergeben sich gefärbte Bereich innerhalb des Zellkerns, in denen TRAIL-R2 als auch p53 getrennt voneinander vorkommen. Eine Kreuzreaktivität konnten wir ausschließen (Abbildung 14).



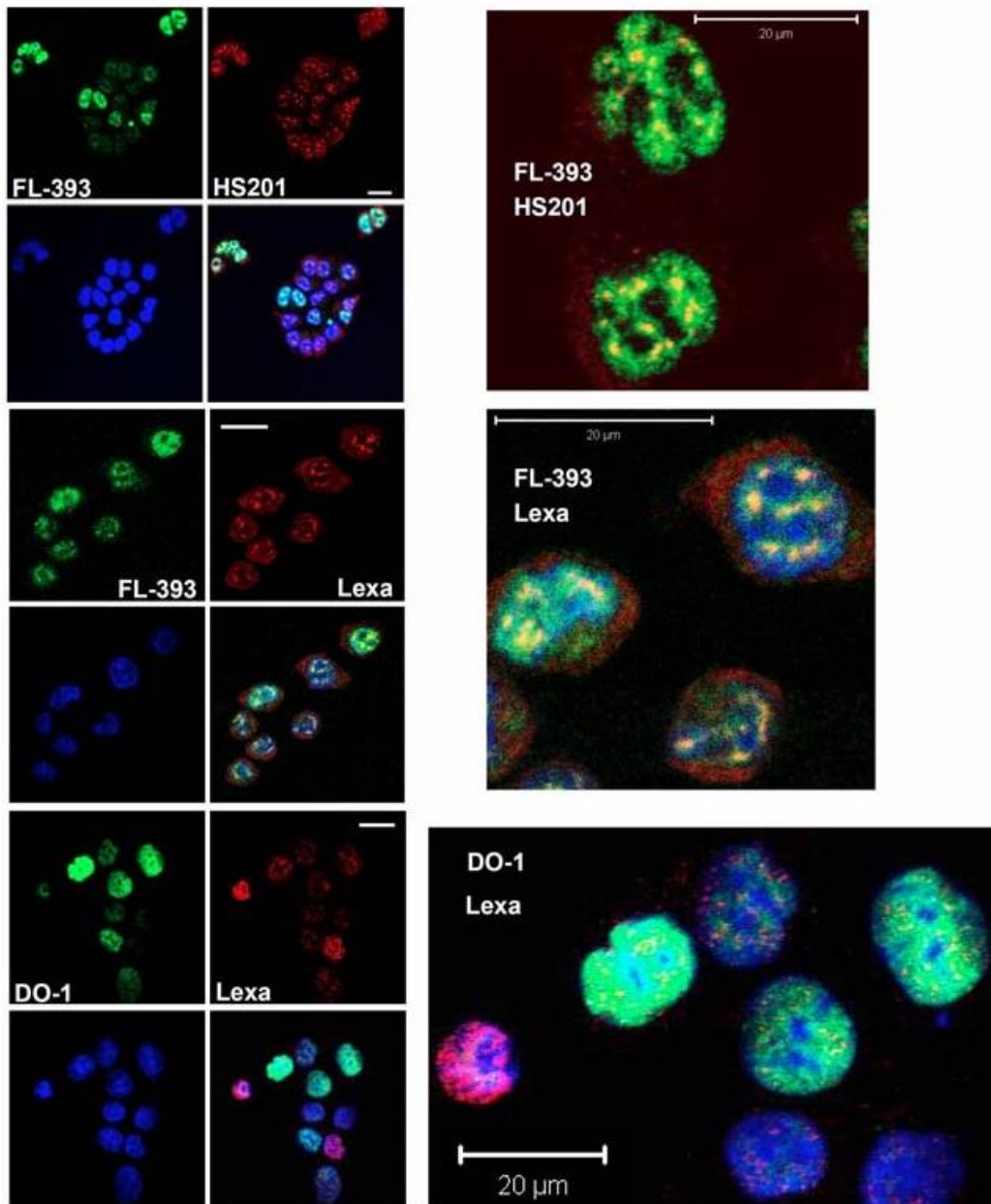


Abbildung 12: Untersuchung der intrazellulären Verteilung von TRAIL-R2 und p53 mittels Immunfluoreszenzfärbung. HCT 116 p53 +/+ Zellen wurden auf Deckgläschen (für konfokale LSM) bzw. in FACS-Röhrchen (für ImageStream®-Färbung) ausgesät und 24 h später durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit anschließender konfokaler LSM (Abb. 11 a) bzw. ImageStream®-Färbung (Abb. 12 b) bezüglich der intrazellulären Distribution von TRAIL-R2 und p53 analysiert. Verwendet wurden als spezifische Primärantikörper gegen TRAIL-R2 Lexatumumab (Lexa), gegen p53 FL-393 und DO-1 (Abb. 12 a), sowie die Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper Alexa-Fluor 546 (rot) und 488 (grün). Zur Kontrolle erfolgte das gleiche Vorgehen unter Verwendung des bereits genutzten und eines weiteren Antikörpers gegen TRAIL-R2 (Lexatumumab und HS201) als auch gegen p53 (FL-393 und DO-1); (Abb. 12 c).

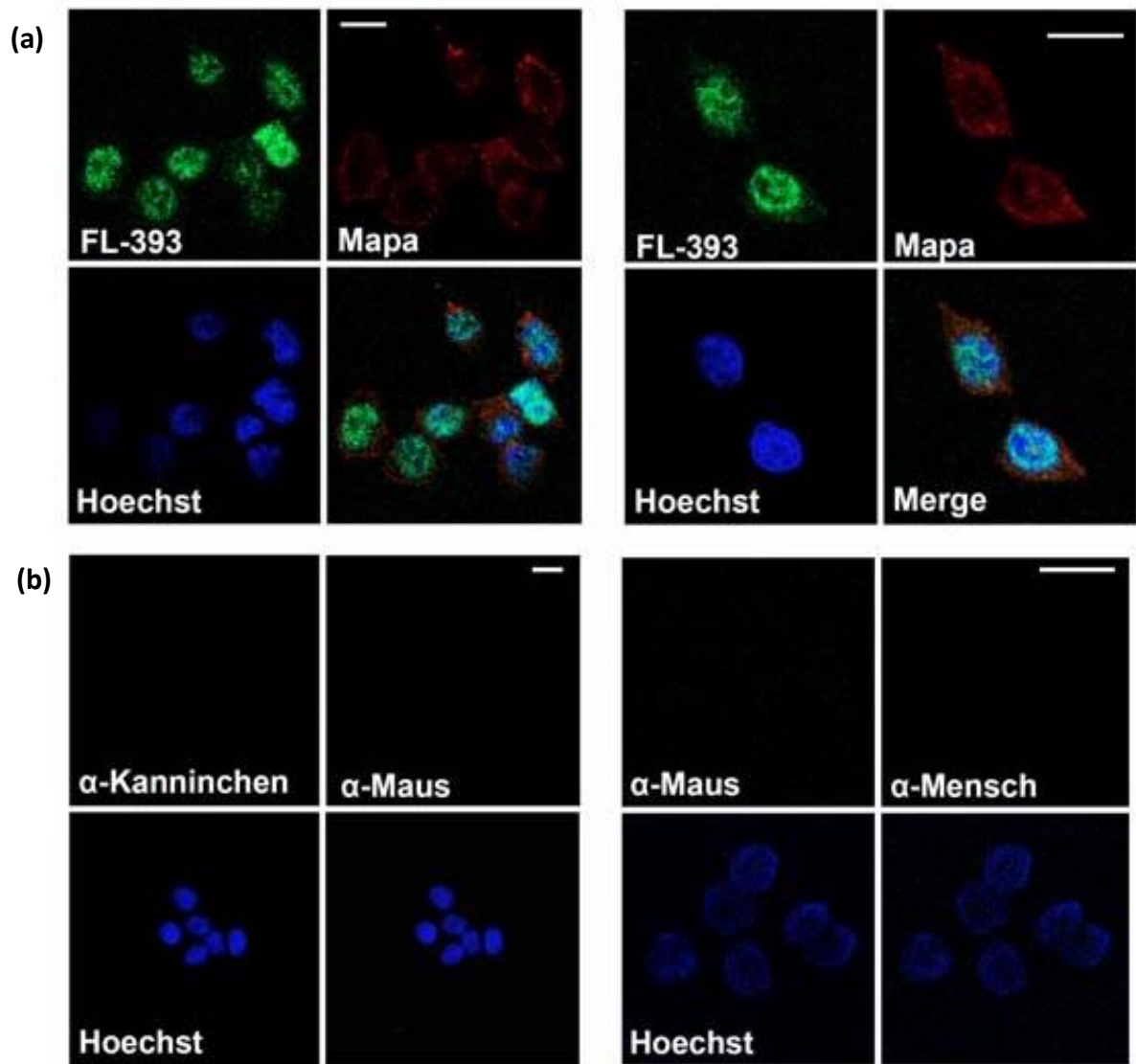


Abbildung 13: Untersuchung der intrazellulären Verteilung und einer möglichen Kolokalisation von TRAIL-R1 und p53 sowie eventueller unspezifischer Bindungen der Antikörper. HCT 116 p53 +/+ Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und 24 h später durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit anschließender konfokaler LSM untersucht. Um eine spezifische Kolokalisation zu überprüfen und auszuschließen, dass nicht auch der Trail-R1 mit p53 kolokalisiert, wurden die Immunfluoreszenzfärbungen unter Verwendung eines anti-TRAIL-R1-Antikörpers (Mapatumumab (Mapa)) wiederholt (Abb. 12 a). Zur weiteren Kontrolle unspezifischer Bindungen erfolgte die Färbung nur mit den Sekundärantikörpern anti-Maus, anti-Mensch sowie anti-Kaninchen (Abb. 12 b). Als fluoreszenz-markierte sekundäre Antikörper wurden Alexa-Fluor 546 (rot) und 488 (grün) eingesetzt und durch die Hinzugabe des Hoechst-Farbstoffes die Zellkerne blau angefärbt.

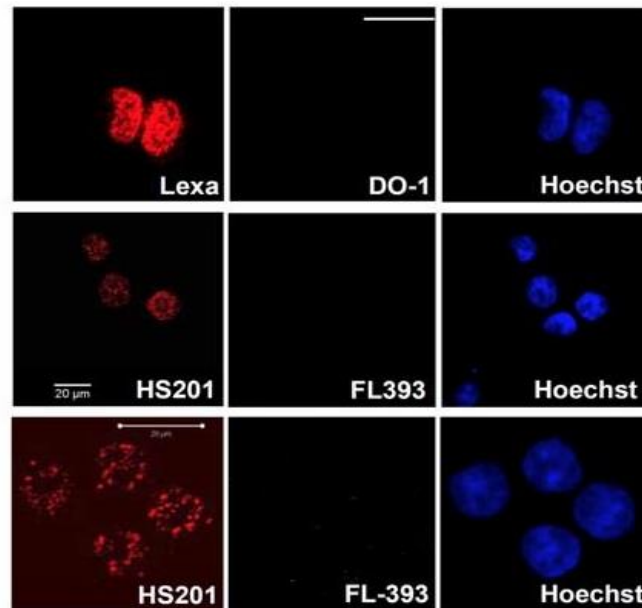


Abbildung 14: Überprüfung der Spezifität der anti-p53-Antikörper mittels Immunfluoreszenzfärbung. P53-KO-Zellen (HCT 116 p53 $-/-$) wurden für 24 h auf Deckgläschen ausgesät und 24 h später durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit anschließender konfokaler LSM untersucht. Verwendet wurden als spezifische Primärantikörper gegen TRAIL-R2 Lexatumumab (Lexa) und HS201 sowie gegen p53 FL-393 und DO-1. Als fluoreszenz-markierte sekundäre Antikörper wurden Alexa-Fluor 546 (rot) und 488 (grün) eingesetzt und durch die Hinzugabe des Hoechst-Farbstoffes die Zellkerne blau angefärbt.

3.2 Überprüfung der Interaktion zwischen TRAIL-R2 und p53 im Zellkern

Aufgrund der beschriebenen regulatorischen Funktionen von TRAIL-R2 und p53 in Bezug auf den Prozess der Reifung von miRNAs im Zellkern als auch aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse der Interaktion im Zellkern, wurde ein weiteres Verfahren durchgeführt, um die Lokalisation beider Proteine im Zellkern zu verifizieren. Hierfür wurden, wie in Abbildung 15 dargestellt, für Immunpräzipitationen die jeweiligen Proteine aus Kernextrakten der HCT116 p53 $+/+$ Zellen mittels TRAIL-R1-spezifischen Antikörpern HS101 (Spur 4, Abb. 15 a) bzw. Mapatumumab (Spur 1, Abb. 15 b) sowie TRAIL-R2-spezifischen Antikörpern HS201 (Spur 5, Abb. 15 a) bzw. Lexatumumab (Spur 2, Abb. 15 b) als auch p53-spezifischem Antikörper DO-1 (Spur 3, Abb. 15 b) ausgefällt. Zudem wurden Kernlysate erstellt, bei denen über Immunpräzipitation der TRAIL-R2 entfernt wurde (Spur 1 vs. Spur 2, Abb. 15a). Aus diesen vorhandenen Lysaten wurde zudem, vergleichbar mit einer „Vorreinigung“, der TRAIL-R2 erneut präzipitiert. (Spur 6, Abb. 15 a). Zur Kontrolle wurden die eingesetzten Antikörper allein mit den Protein-G-Sepharose-Beads inkubiert (Spur 7 u. 8, Abb. 15 a; Spur 4-6, Abb. 15 b), da die Antikörper

selbst jeweilige Banden hervorrufen können und diese vom eigentlichen Präzipitationsergebnis zu unterscheiden sind. Die anschließende Analyse mittels elektrophoretischer Auftrennung und folgendem Western Blot erfolgte dann zur Untersuchung auf das Vorkommen von TRAIL-R1, TRAIL-R2 sowie p53. Das Auftragen des alleinigen Kernlysats, welches nicht zur Immunpräzipitation verwendet wurde, war notwendig, um die zu detektierenden Banden bzw. das Molekulargewicht der untersuchten Proteine einzuordnen (Spur 1, Abb. 15 a). Dies ist insofern wichtig, da es bei den Immunpräzipitationen keine direkte Nachweismethode einer gleichmäßigen Gelbeladung wie z.B. bei Gesamtzelllysaten mittels β -Aktin gibt. Anhand der sich ergebenden Bandenintensität ist jedoch ein Vergleich möglich.

Wie der Abbildung 6 zu entnehmen ist, lassen sich TRAIL-R1 bei den Präzipitationen mit HS101 (Spur 4, Abb. 15 a) und Mapatumumab (Spur 1, Abb. 15 b), TRAIL-R2 bei den Präzipitationen mit HS201 (Spur 5, Abb. 15 a) und Lexatumumab (Spur 2, Abb. 15 b) sowie p53 bei den Präzipitationen mit DO-1 (Spur 3, Abb. 15 b) nachweisen, was bestätigt, dass die Immunpräzipitation erfolgreich abgelaufen ist. Bei den Präzipitationen mit HS201 und Lexatumumab kann eine deutliche Ko-Präzipitation von p53 gezeigt werden (Spur 5, Abb. 15 a; Spur 2, Abb. 15 b). Im Gegensatz dazu kann p53 mit TRAIL-R1 nicht ko-präzipitiert werden (Spur 4, Abb. 15 a). In den Lysaten, in denen der TRAIL-R2 zuvor durch Immunpräzipitationsverfahren entfernt wurde, präzipitiert der Antikörper nichts und die TRAIL-R2-Präzipitate aus den TRAIL-R2-depletierten Zellen enthalten das p53-Protein nicht. (Spur 6, Abb. 15 a). Zusammengenommen spricht dies für eine direkte Interaktion zwischen TRAIL-R2 und p53 im Zellkern. Für TRAIL-R2 wurde zudem bereits herausgefunden, dass dieser aufgrund von Spleißvorgängen in zwei verschiedenen Varianten exprimiert wird. Bei dem TRAIL-R1 ist nur eine Isoform bekannt. Bei beiden Rezeptoren kann es durch post-translationale Modifikationen zu Proteinen verschiedener Größe kommen. Diese Komplexbildung zwischen den beiden Todesrezeptoren bedingt, dass es zu einer Ko-Präzipitation kommt, was sich z.B. darin zeigt, dass TRAIL-R2 in den Präzipitaten von TRAIL-R1 nachgewiesen werden kann (Spur 4, Abb. 15 a). Vergleicht man die Präzipitation mittels Lexatumumab, zeigt sich, dass dieser diejenige TRAIL-R2-Form präzipitiert, die nicht mit dem TRAIL-R1 interagiert (Spur 1 vs. Spur 2, Abb. 15 b).

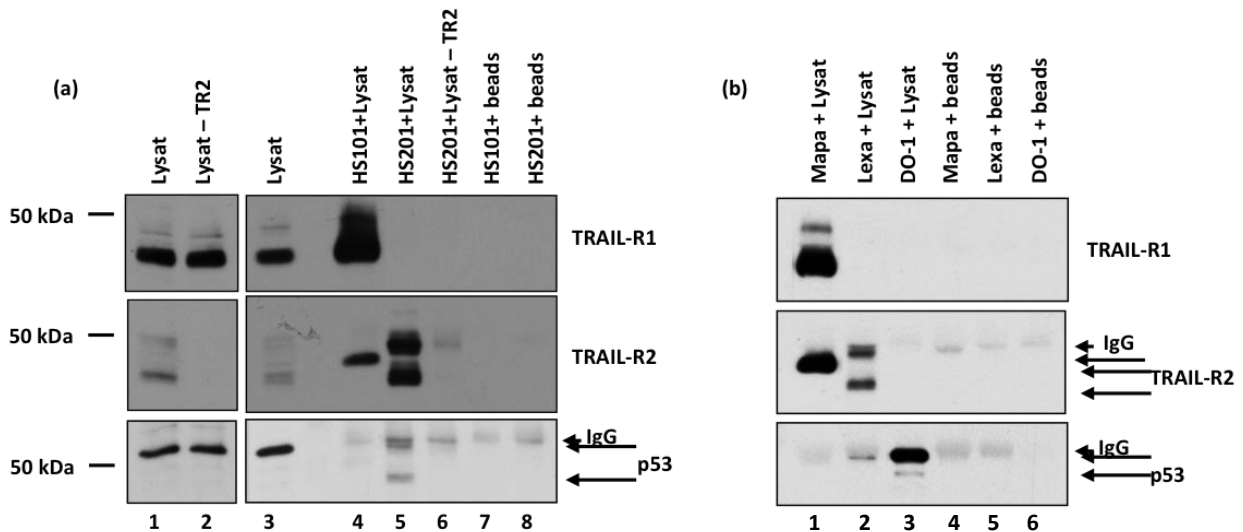


Abbildung 15: Nachweis der nukleären Interaktion zwischen TRAIL-R2 und dem Tumorsuppressorprotein p53 mittels Immunpräzipitation.

(a) Für die Immunpräzipitationen wurden aus HCT116 p53 +/+ Zellen Kernlysate erstellt. Die Präzipitation des TRAIL-R1 und -R2 wurde mit den Rezeptor-spezifischen Antikörpern HS101 (Spur 4) sowie HS201 (Spur 5) durchgeführt. Darüber hinaus wurde der TRAIL-R2 durch einen zusätzlich vorab durchgeführten Immunpräzipitationsschritt aus den Kernlysaten entfernt (Spur 2 vs. Spur 1) und erhaltenes Lysat mit weiterem Immunpräzipitationsschritt analysiert (Spur 6, Abb. a). Zur Kontrolle wurden die eingesetzten Antikörper nur mit den Protein-G-Sepharose-Beads inkubiert (Spur 7 u. 8).

(b) Es folgte die Durchführung einer weiteren Immunpräzipitation, jedoch unter Verwendung anderer spezifischer Antikörper. Hierfür wurden der TRAIL-R1 mittels Mapatumumab („Mapa“; Spur 1) und der TRAIL-R2 mittels Lexatumumab („Lexa“; Spur 2) sowie dieses Mal auch das Tumorsuppressorprotein p53 durch DO-1 (Spur 3) präzipitiert. Zur Kontrolle wurden die Antikörper ebenfalls allein mit den Beads inkubiert (Spur 4-6, Abb. b).

Beide Versuche wurden auf das Vorliegen von TRAIL-R1, -R2 und p53 durch das Western Blot Verfahren analysiert, wozu jeweils 10 µl des Lysats sowie 10 µg des nicht zur Immunpräzipitation verwendeten Kernlysats aufgetragen wurden (vgl. Spur 1 u. 2, Abb. a).

3.3 Einfluss des TRAIL-Rezeptorstatus auf die p53-Aktivität

Die nachgewiesene Kolokalisation von Trail-R2 und p53 bedeutet nicht zwangsläufig, dass auch gleichzeitig eine funktionelle gegenseitige Beeinflussung beider Proteine vorliegt. Um nun herauszufinden, ob und an welchen Punkten der postulierte Einfluss des TRAIL-Rezeptorstatus auf das Tumorsuppressorprotein p53 greift, wurde sich zuerst dessen Aktivierung konzentriert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden für den Versuchsaufbau WT-p53 HCT 116 Zellen untersucht, bei denen der TRAIL-R2 im Vorfeld mittels unterschiedlichen siRNAs transient herunterreguliert wurde. Als Kontrolle wurden Zellen mit einer negativ-Kontrolle transfiziert, in denen somit kein Rezeptorknockdown hervorgerufen wurde. Parallel dazu wurde eine Variante verwendet, in der die Zellen mittels 10 μ M 5-FU (5-Fluorouracil) stimuliert bzw. als Kontrolle nicht stimuliert wurden. Das zu den Antimetaboliten gehörende Chemotherapeutikum 5-FU wird durch seine strukturelle Ähnlichkeit zu den Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin in die DNA sowie zur Nukleinbase Uracil in die RNA eingebaut. So bewirkt es aufgrund der dann fehlerhaft ablaufenden Protein- und DNA-Synthese eine Inhibierung der Zellteilung und folglich eine Aktivierung von p53. Um sicherzustellen, dass der Rezeptor-Knockdown in den mit siRNA gegen TRAIL-R2 transfizierten Zellen funktioniert hat, erfolgte der Nachweis per Western Blot (s. Abb. 16). Wie die Abbildung 17 zeigt, kann in den Zellen, in denen der TRAIL-R2 transient herunterreguliert wurde, eine Steigerung der p53-Aktivität gemessen werden. Auf die Kontrolle (Ksi) bezogen, ist die Aktivität des Tumorsuppressors so je nach verwendeter siRNA 1,4- (On-Targetplus[®]) bzw. 1,6-fach (Silencer[®]Select) gesteigert. Zur weiteren Kontrolle der Wertigkeit des Aktivitätsassays ist eine deutliche Aktivierung der p53-Aktivität durch vorherige Behandlung mittels 5-FU sichtbar.

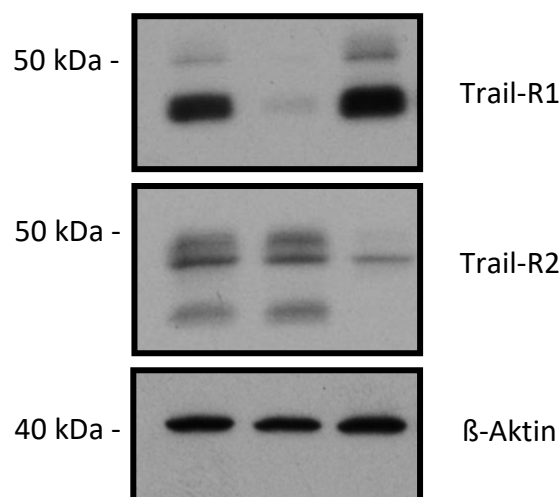


Abbildung 16: Kontrolle des Trail-R1- und R2-Knockdowns. HCT 116 p53 WT Zellen wurden transient mit TRAIL-R1 oder -R2-siRNA oder einer Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 48h Inkubationszeit wurden die jeweiligen Proteinlevel via Westernblot bestimmt. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet.

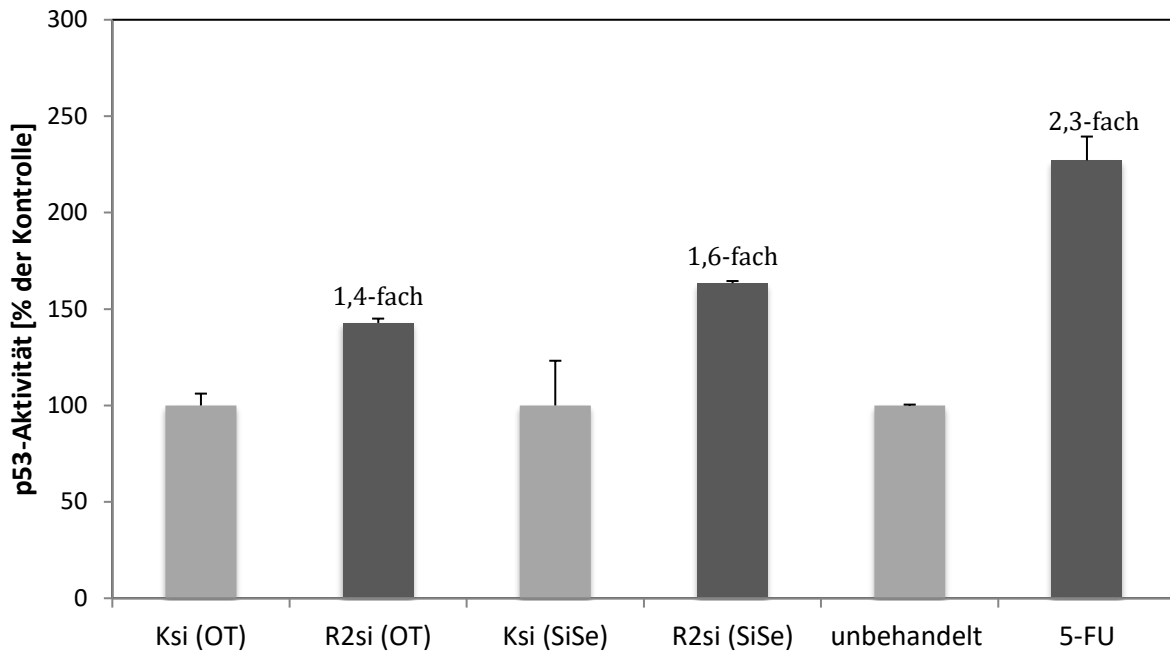


Abbildung 17: Untersuchung des Einflusses von TRAIL-R2 auf die Aktivierung von p53. Für den Versuch wurden die HCT116 p53 +/+ Zellen transient mit zwei verschiedenen siRNAs (On-Targetplus® oder Silencer®Select) gegen TRAIL-R2 (R2si) bzw. Kontroll-siRNA (Ksi) transfiziert. Nach 48h erfolgte die Erstellung von RIPA-Zellysaten und anschließend die Aktivitätsbestimmung von p53 mittels kommerziellem p53-Aktivitäts-Assay (TransAM® p53; Active Motif). Als Kontrolle wurden parallel unbehandelte bzw. für 24h mit 5-FU behandelte HCT116 p53 +/+ Zellysate analysiert. Die Messdaten sind Mittelwerte + Standardabweichung. OT: On-Targetplus®-siRNA; SiSe: Silencer®Select siRNA; 5-FU: 5-Fluorouracil

3.4 Einfluss des TRAIL-R2-Status auf wichtige Targetproteine des Tumorsuppressorproteins p53

Dass es bei einer Hemmung des TRAIL-R2 zu einer gesteigerten Aktivität von p53 kommt, brachte die Frage hervor, ob und inwiefern sich der Todesrezeptorstatus auch auf die Expression der p53-Zielgene des Tumorsuppressorproteins auswirkt bzw. der gezeigte Einfluss auf p53 die weiteren Signalwege beeinflusst. Dazu wurden die WT-p53 exprimierenden HCT116-Zellen transient mit unterschiedlichen siRNAs gegen TRAIL-R2 sowie Kontroll-siRNAs transfiziert und die Expression von p53-Zielgenen mit Western Blot Analyse untersucht. Zum Einsatz kamen hierfür Antikörper, die spezifisch die p53-Zielgene BAX, und p21 sowie den p53-Regulator MDM2 erkennen. Bei einem Knockdown des TRAIL-R2 kam es in den HCT116 p53 +/+ Zellen zu einer klaren Steigerung der BAX-Expression, die in den p53-knockout Zellen nicht zu sehen war. Ebenfalls von Interesse war das MDM2, welches bereits in der Einleitung als wichtigster negativer Regulator von p53 beschrieben wurde. Durch die Eigenschaft aktiviertes

WT p53 direkt binden und über Ubiquitinierung den Abbau von p53 initiieren zu können, sinken die p53-Level binnen kurzer Zeit wieder ab. Wie die Abbildung 18 zeigt, führt eine Herunterregulation von TRAIL-R2 zu erhöhten Leveln von MDM2. In den p53-knock-out-Zellen lassen sich ebenfalls schwache Bandenmuster nachweisen, der steigernde Effekt der TRAIL-R2-Hemmung auf das MDM2 ist hier allerdings höchstens minimal zu erkennen. Als weiteres Zielgen sollte p21 untersucht werden. Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, führt der Knockdown von TRAIL-R2 in den WT-p53-tragenden Zellen zu einer deutlichen Zunahme der p21-Expression. Die dargestellten Ergebnisse konnten durch Verwendung einer anderen siRNA bestätigt werden, wobei sich auf eine Analyse des Zellzyklusregulators p21 beschränkt wurde und andere p53-Zielgene nicht nochmals untersucht wurden. Zudem wurde die Analyse um den TRAIL-R1 erweitert, um die Sensitivität des TRAIL-R2-Effekts zu überprüfen. Auch hier ist wieder eine deutliche Hochregulation der p21-Expression als Folge des TRAIL-R2-knockdowns zu verzeichnen, während der Knockdown von TRAIL-R1 keinen Effekt auf die Expression von p21 zeigt.

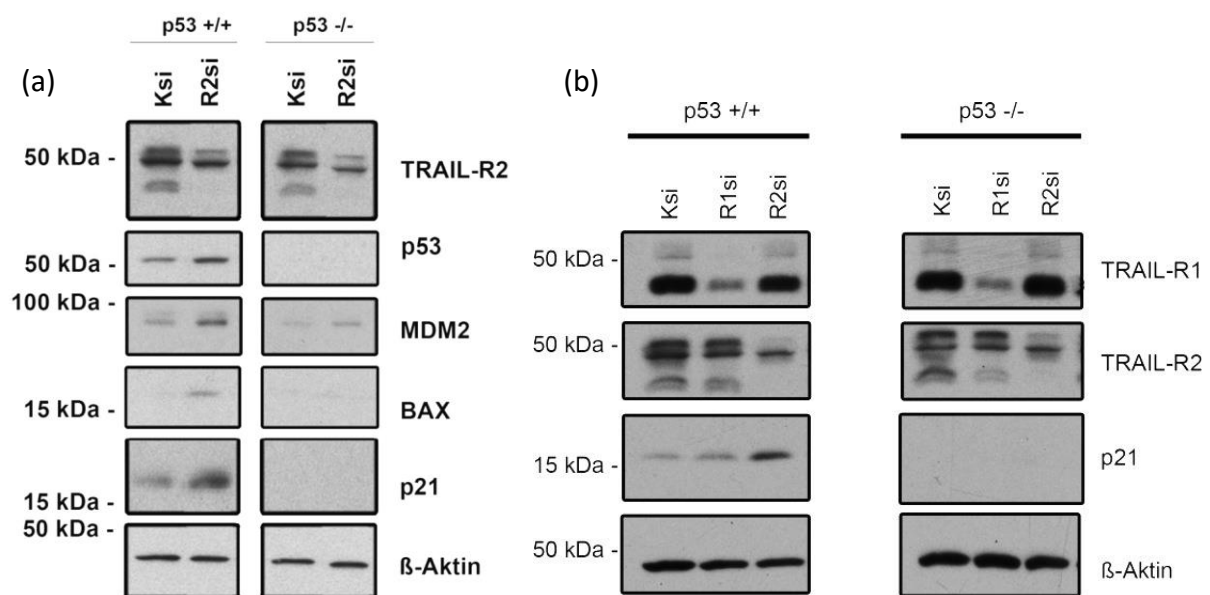


Abbildung 18: Analyse der Auswirkung einer TRAIL-R2-Hemmung auf ausgewählte p53-Targetproteine. Die HCT 116 p53 +/+ und -/- Zellen wurden mit unterschiedlichen siRNAs gegen den TRAIL-R2 sowie einer Kontroll-siRNA für 48 h transfiziert. Anschließend erfolgte die Erstellung von Ganzzelllysaten, die im Weiteren mittels Western Blot Analyse und unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen MDM2, BAX und p21 sowie zur Kontrolle der Knockdowns gegen TRAIL-R1 und -R2 untersucht wurden. Zur Elektrophorese wurden jeweils 10 μ g Protein aus Gesamtzelllysaten auf ein SDS-Gel aufgetragen. Als Ladekontrolle erfolgte die Überprüfung der Expression von β -Aktin.

3.5 Einfluss des TRAIL-R2-Status auf die Aktivität des p21-Promotors

Die deutlich höhere Expression von p21 in den HCT 116 p53 +/+ Zellen, bei denen zuvor der TRAIL-R2 herunterreguliert wurde, sollte erweitert eruiert werden. Hierzu wurden Promotor-Aktivitäts-Assays durchgeführt, mit denen untersucht werden sollte, ob ein Rezeptorknock-down zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität von p53 führt. Das Assay untersucht nun die Regulation der Promotorexpression. Mit den siRNAs On-Targetplus® oder Silencer®Select gegen den TRAIL-R2 sowie der Kontroll-siRNA wurden die kolorektalen Zellen HCT 116 p53 +/+ und HCT116 p53 -/- für 48 h behandelt. Es werden Konstrukte produziert, welche die regulatorische Einheit des Zielproteins gekoppelt an eine Sequenz mit Luziferase-codierender DNA enthalten. Ein weiteres Konstrukt enthält das Protein, welches vermutet wird, die Transkription von p53 zu beeinflussen. Anschließend werden die Zellen mit beiden Konstrukten transfiziert. Wenn eine Herunterregulation der Transkription durch das Protein stattfindet, werden die Zellen weniger Luziferase exprimieren, es folgt ein schwächeres/gar kein Lichtsignal. Findet eine Heraufregulation statt, wird ein stärkeres Lichtsignal detektierbar sein. In dieser Arbeit wurden so p21-Promotoren verwendet, die entweder eine vorhandene oder eine deletierte p53-Bindungsstelle trugen (s. Abb. 19).

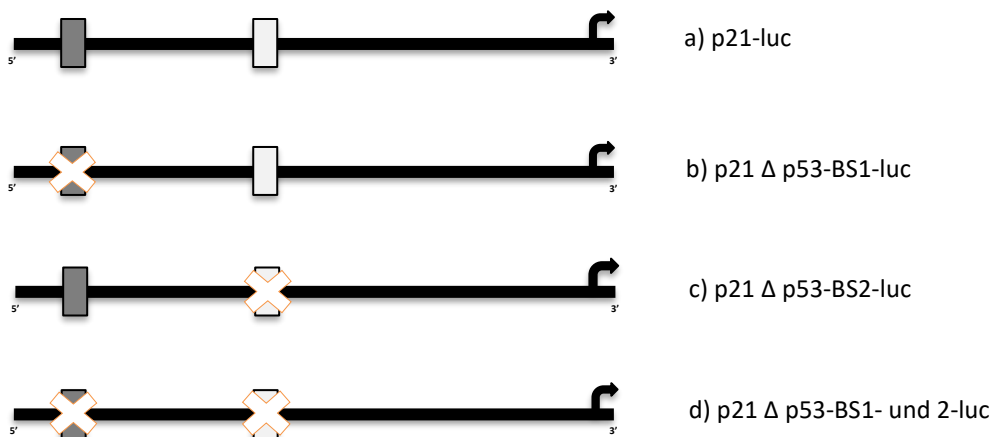


Abbildung 19: Schematische Darstellung der p21-Konstrukte. Gezeigt sind die verwendeten p21-Promotoren. p21-luc ist der unveränderte Promotor (a), p21 Δ p53-BS1- oder 2-luc mit jeweils einer deletierten p53-Bindungsstelle (b und c) und p21 Δ p53-BS1- oder 2-luc mit zwei deletierten p53-Bindungsstellen.

Die Aktivität der Luziferase wurde mithilfe eines Luminometers gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass der Knockdown des TRAIL-R2 zu einer Verdopplung der Aktivierung des p21-

Promotors führt (Abbildung 20). Dieser Effekt lässt sich in den Zellen reproduzieren, in denen der p21-Promotor zwei Bindungsstellen für p53 enthält. Entfernt man eine dieser Bindungsstellen für p53, verringert sich die Aktivität des p21-Promotors drastisch. Interessanterweise ist hier allerdings nach wie vor ein Unterschied der Promotoraktivität zwischen der Kontrolle (Ksi) und dem herunterregulierten TRAIL-R2 (R2si) beständig. In den Zellen mit p21-Promotoren ohne jegliche p53-Bindungsstellen ist nicht nur die zuvor beobachtete Promotoraktivierungssteigerung nicht mehr sichtbar, die Unterschiede zwischen der Kontrolle und dem gehemmten TRAIL-R2 haben sich ebenfalls angeglichen.

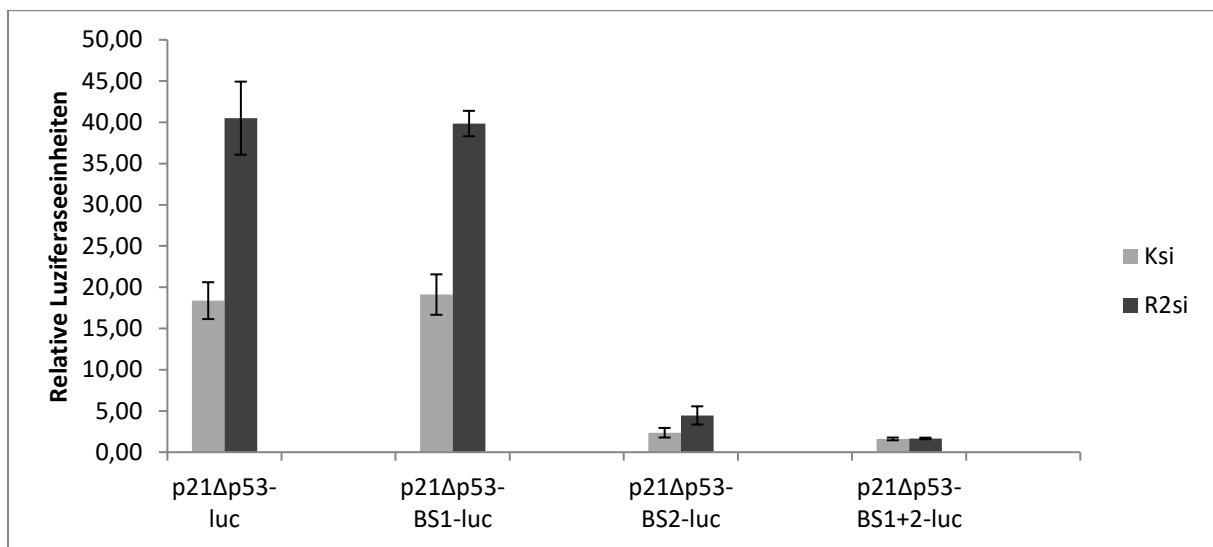


Abbildung 20: Untersuchung des Einflusses der TRAIL-R2-Hemmung auf die Aktivierung des p21-Promotors. Die HCT116 p53 +/+ Zellen wurden für 48h transient mit On-Targetplus® siRNA gegen TRAIL-R2 bzw. mit Kontroll-siRNA transfiziert. Darauf folgte für weitere 24h eine Transfektion mit Plasmiden, die das Luziferasegen unter der Kontrolle des p21-Promotors trugen. Verwendet wurden p21-Promotoren, die zwei p53-Bindungsstellen (p21-luc), jeweils eine deletierte p53-Bindungsstelle (p21 Δ p53-BS1- oder 2-luc) oder zwei deletierte p53-Bindungsstellen trugen (p21 Δ p53-BS1+2-luc). Die mittels Luminometer gemessenen Werte stellen Mittelwerte + Standardabweichung dar. Die ermittelten Ergebnisse sind gegen den Kontroll-Renilla-Reporter normalisiert.

Um die durch die vorherigen Ergebnisse postulierten Abhängigkeit der Resultate vom p53-Status zu untermauern, wurde das Luziferase-Assay unter Verwendung des gesamten p21-Promotors (p21-luc) sowie mit deletierten p53-Bindungsstelle (p21 Δ p53-luc) für die WT-p53-tragenden HCT 116 Zellen wiederholt als auch für p53-KO-HCT 116 Zellen durchgeführt (Abbildung 21). Eine Hemmung des TRAIL-R2 bewirkt in den Wildtyp p53-tragenden HCT 116-Zellen, nicht aber in den p53-KO-Zellen eine Aktivierung des p21-Promotors. Unter Wegnahme der p53-Bindungsstellen ist diese Aktivierung nicht mehr zu verzeichnen (siehe vorheriger Versuchsaufbau). Interessanterweise zeigt sich bei den p21 Δ p53-luc-Zellen eine p53-unabhängige Reduktion der p21-Promotoraktivität innerhalb der KO-p53-Zellen.

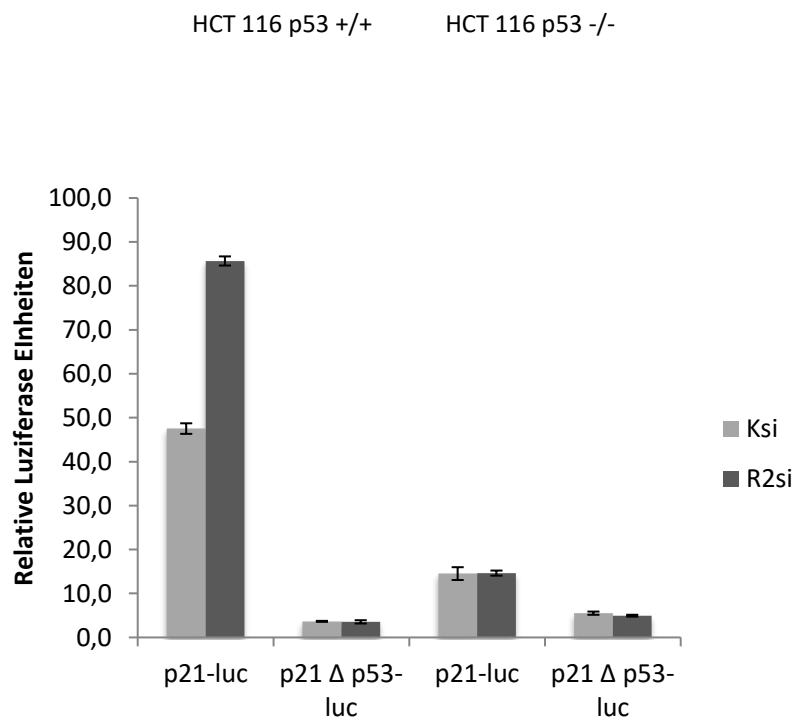


Abbildung 21: Untersuchung des Einflusses des TRAIL-R2-Knockdowns auf die Aktivierung des p21-Promotors in Abhängigkeit vom p53-Status. Die HCT116 p53 +/+ sowie p53 -/- Zellen wurden für 48h transient mit On-Targetplus® siRNA gegen TRAIL-R2 bzw. mit Kontroll-siRNA transfiziert. Darauf folgte die Transfektion der p21-Plasmide, an die das Luziferasegen gekoppelt wurde. Verwendet wurden die p21-Promotoren mit (p21-luc) sowie ohne (p21 Δ p53-luc) p53-Bindungsstellen. Die mittels Luminometer gemessenen Werte stellen Mittelwerte + Standardabweichung dar. Die ermittelten Ergebnisse sind gegen den Kontroll-Renilla-Reporter normalisiert.

Um die Bedeutung von endogenem TRAIL auf die p53-Aktivität zu untermauern, wurden weitere Luziferase-Assays durchgeführt, bei denen zur Hemmung von TRAIL ein neutralisierender anti-TRAIL-Antikörper eingesetzt wurde (Abbildung 22). Die Transfektion der WT- und KO-p53-tragenden HCT 116 Zellen erfolgte erneut unter Verwendung der p21-Promotoren mit (p21-luc) oder ohne (p21 Δ p53-luc) p53-Bindungsstellen. Der Hemmung von TRAIL zeigt keinerlei

Veränderungen in Hinsicht auf die Aktivierung des p21- Promotorstatus in den HCT 116 p53 +/- Zellen. Der bereits beobachtete Effekt einer gesteigerten p21-Promotoraktivierung durch TRAIL-R2-Knockdowns, sowie die Erkenntnis, dass dieses Ergebnis in p53-KO-Zellen nicht mehr zu verzeichnen ist, kann hier reproduziert werden. Trotzdem ist auch hier eine niedrige, aber vorhandene basale Aktivität des p21-Promotors in den p53-deletierten Zellen zu messen. Dabei findet sich allerdings der Unterschied, dass unter Ausschalten des endogenen TRAIL keine Messunterschiede zwischen den Promotoren mit oder ohne p53-Bindungsstelle auftreten und damit die zuvor p53-unabhängige gehemmte p21-Promotoraktivität aufgehoben wird. Hier wird jedoch ersichtlich, dass die Neutralisation des endogenen TRAIL die Hemmung der Aktivität des p21-Promotors in den p53-KO-Zellen aufhebt.

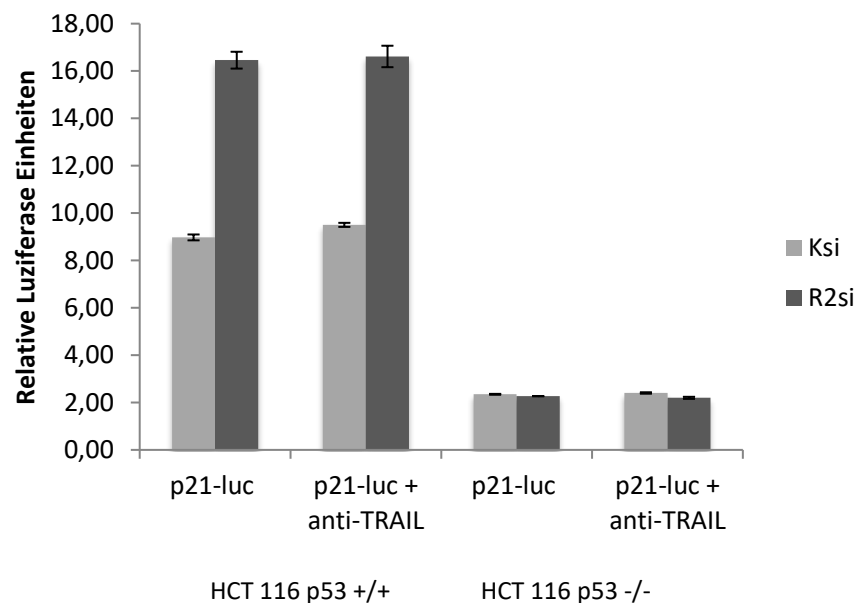


Abbildung 22: Untersuchung des Einflusses der TRAIL-R2-Hemmung auf die Aktivierung des p21-Promotors in Abhängigkeit vom p53-Status sowie endogenem TRAIL. Die HCT116 p53 +/- sowie p53 -/- Zellen wurden für 48h transient mit On-Targetplus® siRNA gegen TRAIL-R2 bzw. mit Kontroll-siRNA transfiziert. Darauf folgte die Transfektion der p21-Promotoren, an die das Luziferasegen gekoppelt wurde. Verwendet wurden die p21-Promotoren mit p53-Bindungsstellen (p21-luc). Um die Hemmung von TRAIL zu erzielen, wurde ein neutralisierender anti-TRAIL-Antikörper eingesetzt. Die mittels Luminometer gemessenen Werte stellen Mittelwerte + Standardabweichung dar. Die ermittelten Ergebnisse sind gegen den Kontroll-Renilla-Reporter normalisiert.

3.6 Einfluss von TRAIL-R2 auf die p53-vermittelte Proliferations- sowie EMT-Regulation

Wie in der Einleitung erläutert, besteht ein negativer Feedbackmechanismus zwischen den Mitgliedern der miR-200- sowie der ZEB-Familie. Interessanterweise konnte zudem herausgefunden werden, dass das Tumorsuppressorprotein p53 dazu fähig ist, miR-200 hoch zu regulieren und damit indirekt hemmenden Einfluss auf die epitheliale-mesenchymale Transition

ausüben kann¹⁰³. Da TRAIL-R2 p53 reguliert, sollte daher überprüft werden, ob sich eine Änderung des TRAIL-Rezeptorstatus auch auf diesen Regelkreis auswirkt. Zunächst wurden die miR-200-Level in Abhängigkeit vom TRAIL-Rezeptorstatus untersucht. Hierzu wurden die HCT 116 p53 +/+ und -/- Zellen für 48 h transient mit der gegen TRAIL-R2 gerichteten siRNA bzw. einer Kontrolle transfiziert. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen mithilfe des mirVana miRNA Isolation Kits nach Herstellerprotokoll isoliert und die enthaltene RNA-Konzentration per NanoDrop spektralphotometrisch bestimmt. In Kooperation mit Prof. Thomas Brabletz (FAU-Universität, Erlangen) fanden die weiteren Untersuchungen mit Real Time PCR. Wie der Abbildung 23 zu entnehmen ist, bringt die Hemmung der TRAIL-R2-Expression in den p53-exprimierenden Zellen eine Steigerung der Expressionsstärke von miR-200-Familienmitgliedern hervor. In den KO-p53 Zellen zeigt sich dieser Effekt genau umgekehrt, sodass hier die Rezeptorhemmung zu einer verminderten miR-200-Expression führt. Generell liegt in den HCT 116 p53 -/- Zellen auch in den Kontrollen eine teils sogar höhere oder ähnliche basale miRNA-Expression vor, als in denen mit positivem p53-Status.

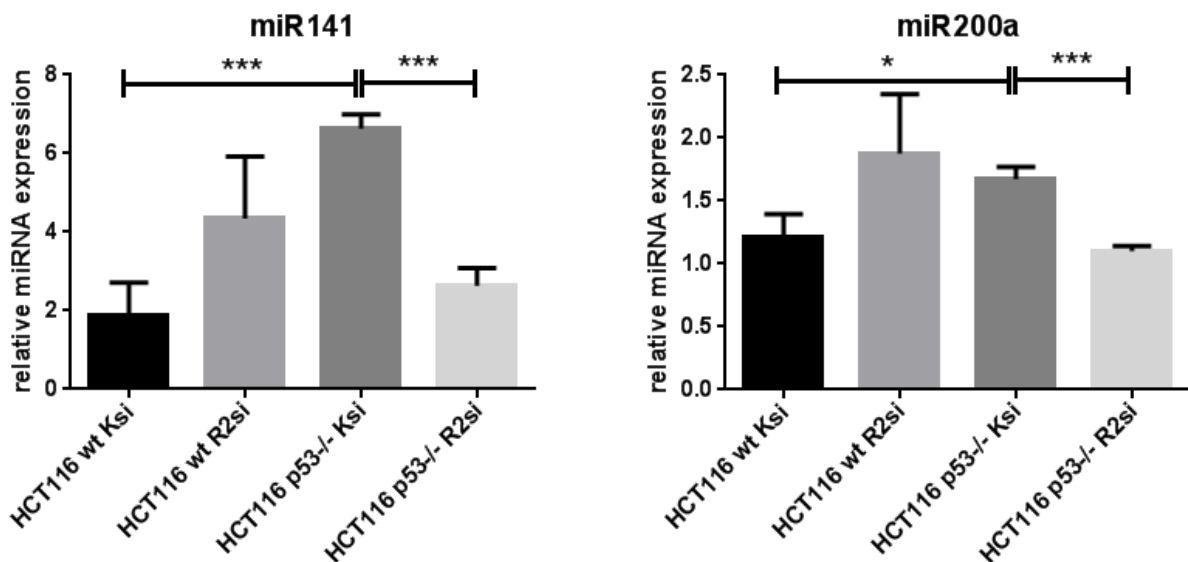


Abbildung 23: Analyse des Effekts der TRAIL-R2-Hemmung auf die Expression ausgewählter miR-200-Familienmitglieder. Nach der siRNA-Transfektionen von HCT 116 p53 +/+ sowie -/- Zellen gegen TRAIL-R2 bzw. einer Kontroll-siRNA wurde die RNA aufgereinigt und vertretungsweise die Expressionsstärke zweier Mitglieder der miR-200-Familie mittels Real Time PCR analysiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Die Sternmarkierungen zeigen signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Kontroll- und spezifischen Transfektionen. (*) entspricht einem P-Wert <0,05, (***) entspricht einem P-Wert <0,001.

Um festzustellen, inwieweit der TRAIL-Rezeptorstatus Einfluss auf den Regelkreis zwischen p53, miR-200 sowie ZEB-Faktoren und damit auf den Prozess der EMT ausübt, wurde erneut mithilfe des Luziferase-Assays gearbeitet. Die verwendeten miR-200c-Promotorkonstrukte wurden in Kooperation mit Prof. Heiner Schäfer (Labor für Molekulare Gastroenterologie, I. Medizinische Klinik, CAU Kiel) erstellt. Die kolorektalen HCT 116 p53 +/+ und HCT 116 p53 -/- Zellen wurden für 48 h mit der siRNA gegen den TRAIL-R2 bzw. der Kontroll-siRNA behandelt. Anschließend erfolgte für zusätzliche 24 h die Plasmidtransfektion. Die Plasmide enthielten einen miR-200c-Promotor sowie daran gekoppelt das Luziferasegen. Zur Verwendung standen verschiedene miR-200c-Konstrukte, die entweder p53- sowie ZEB-Bindungsstellen enthielten oder in denen diese jeweils deletiert wurden (Abbildung 25). Parallel zu den Luziferase-Assays wurden auch Gesamtzelllysate erstellt, die in einer Western Blot Analyse auf die Expression von ZEB-1 und E-Cadherin geprüft wurden (Abbildung 24). Hier ist zu sehen, dass die Herunterregulation von TRAIL-R2 in den HCT 116 p53 +/+ Zellen zur einer starken Abnahme der Mengen von ZEB-1 führt, während dieses Resultat in den KO-p53-Zellen kaum sichtbar ist. Des Weiteren ist in den WT-p53- im Gegensatz zu den p53-negativen Zellen nach Hemmung von TRAIL-R2 eine Erhöhung der Expression an E-Cadherin zu verzeichnen.

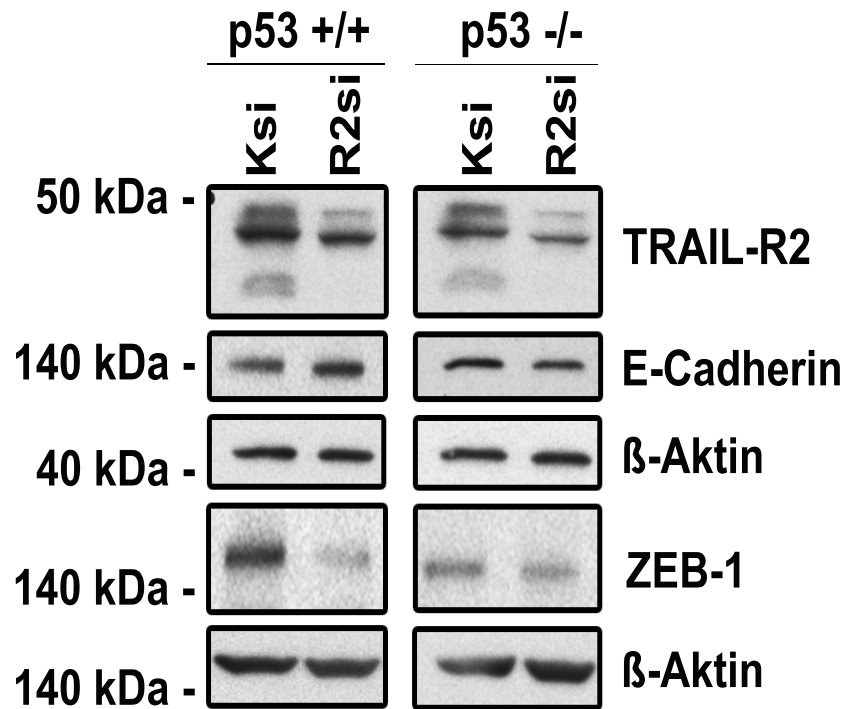


Abbildung 24: Analyse der Auswirkung einer Hemmung des TRAIL-R2 auf die zentralen EMT-Proteine ZEB-1 und E-Cadherin. Die HCT 116 p53 +/+ und -/- Zellen wurden mit Kontroll- sowie gegen TRAIL-R2 gerichteter siRNA für 48 h transfiziert. Anschließend erfolgte die Erstellung von Ganzzelllysaten, die im Weiteren mittels Western Blot Analyse und unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen ZEB-1 als auch E-Cadherin sowie zur Kontrolle des Knockdowns gegen TRAIL-R2 untersucht wurden. Zur Elektrophorese wurden jeweils 10 μ g Protein aus den Gesamtzelllysaten auf ein SDS-Gel aufgetragen. Als Ladekontrolle wurde die Expression von β -Aktin überprüft.

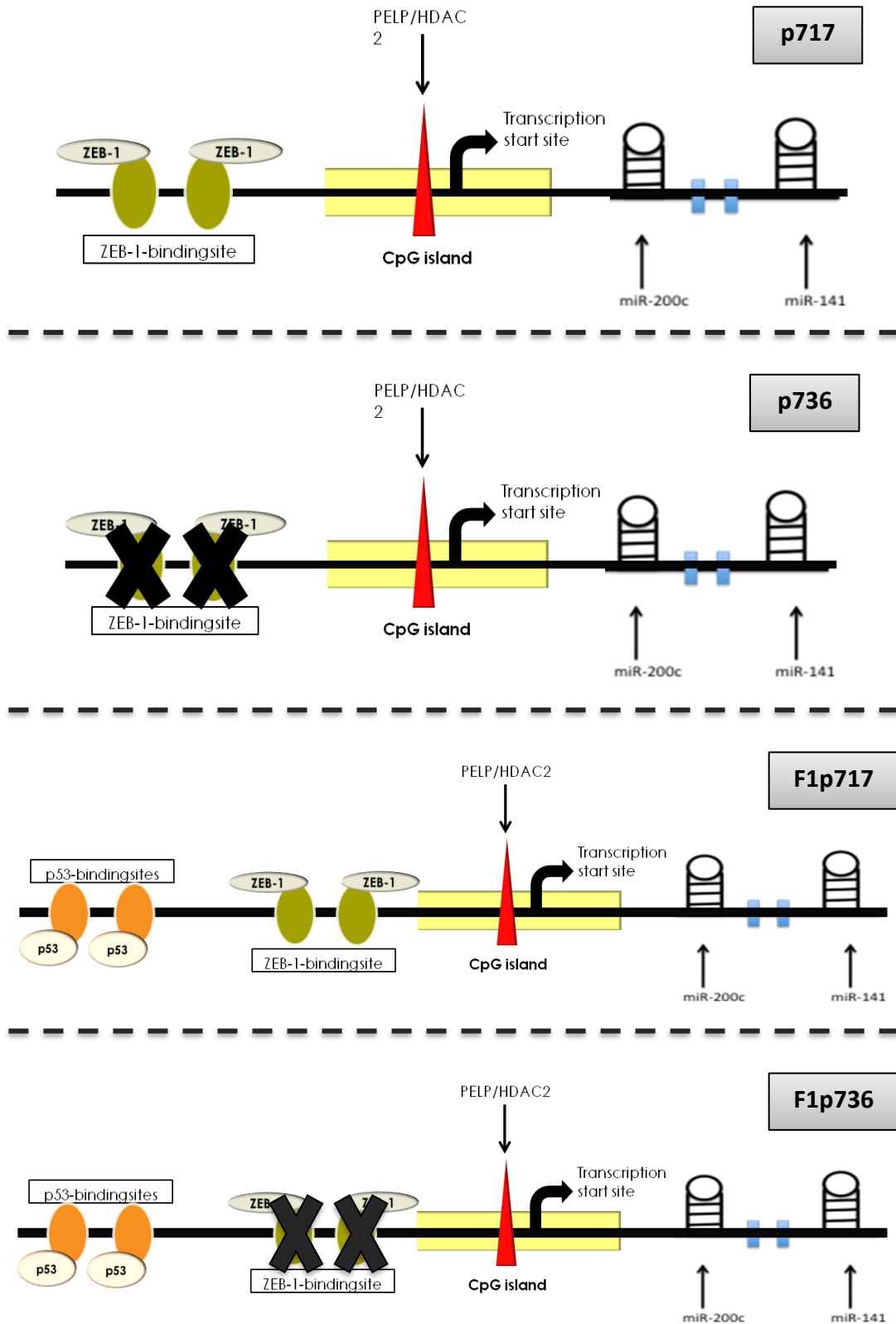


Abbildung 25: Schematische Darstellung der mi-R-200c-Konstrukte. Gezeigt sind die verwendeten mi-R-200c-Promotoren. P717 enthält keine p53-, jedoch die ZEB-1-Bindungsstellen; p736 enthält weder p53- noch ZEB-1-Bindungsstellen; F1 p717 entspricht dem Promotor p717 mit zusätzlichen p53-Bindungsstellen; F1 p736 entspricht dem Promotor p736, enthält allerdings keine ZEB-1-Bindungsstellen mehr.

In dem ersten Promotor-Aktivitäts-Assay kann gezeigt werden, dass es unter TRAIL-R2-Knockdown zu einer Zunahme der miR-200c-Promotoraktivität kommt (Abbildung 26). Diese gesteigerte Aktivität potenziert sich abermals, wenn ein Promotor untersucht wurde, der keine ZEB-1-Bindungsstelle enthält (entspr. Promotor „p736“). Fügt man nun p53-Bindungsstellen in den miR-200c-Promotor ein, wird ersichtlich, dass die Promotoraktivität nochmals deutlich erhöht wird und auch das Entfernen der ZEB-1-Bindungsstellen dieses Resultat steigert (Abbildung 27). Auch in den KO-p53-Zellen ist der Anstieg der Promotoraktivität unter Wegnahme der ZEB-Bindungsstellen sowie herunterreguliertem TRAIL-R2 ebenfalls zu sehen, jedoch schwächer ausgeprägt als in den WT-p53-Zellen (Abbildung 27).

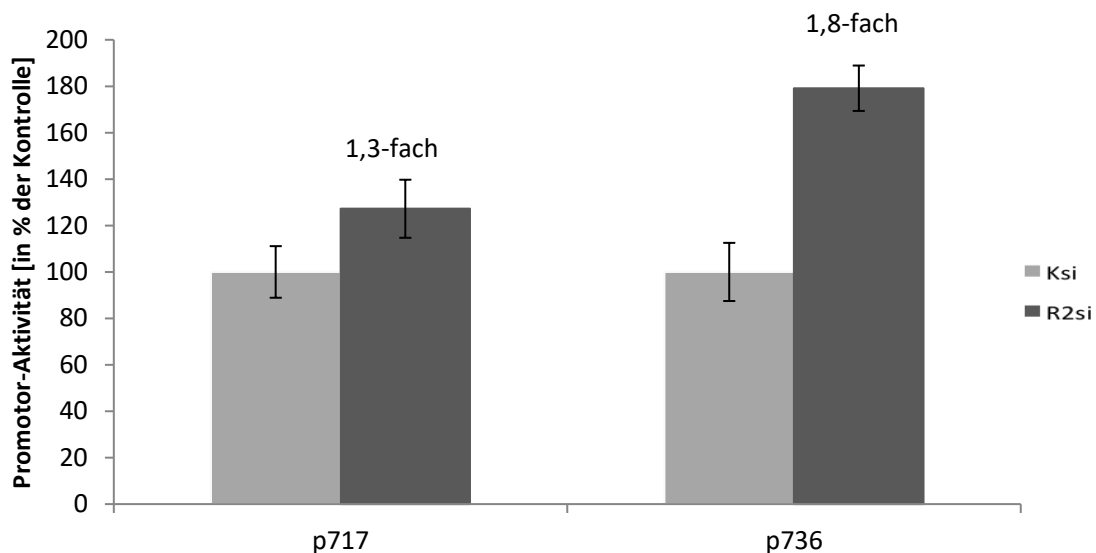


Abbildung 26: Analyse des Einflusses von TRAIL-R2 auf die ZEB- und p53-vermittelte Regulation der Aktivität des miR200c-Promotors in WT-p53-Zellen. Die HCT116 p53 +/+ Zellen wurden für 48 h transient mit siRNA gegen TRAIL-R2 bzw. mit Kontroll-siRNA transfiziert. Darauf folgte für weitere 24 h die Transfektion mit den Luziferase-gekoppelten miR-200c-Promotoren. Verwendung fanden miR-200c-Promotoren, die keine p53-Bindungsstellen und entweder vorhandene (p717) oder entfernte (p736) ZEB-Bindungsstellen vorwiesen. Die mittels Luminometer gemessenen Werte stellen Mittelwerte + Standardabweichung einer Versuchsreihe als repräsentativen Versuch dar.

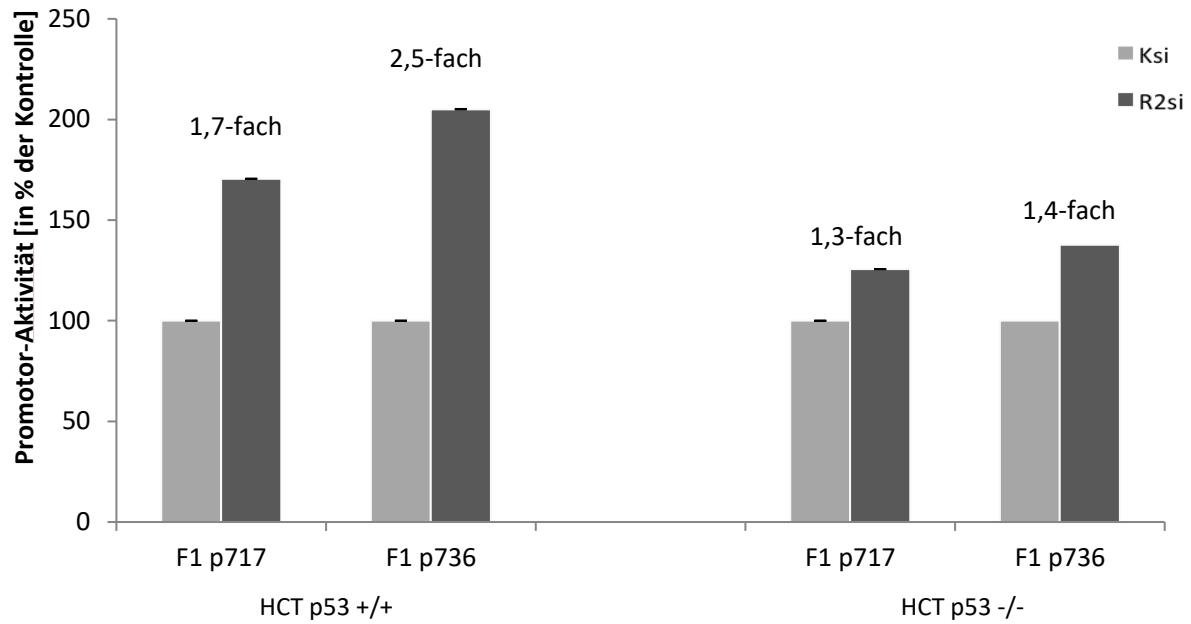


Abbildung 27: Analyse des Einflusses von TRAIL-R2 auf die ZEB- und p53-vermittelte Regulation der Aktivität des miR200c-Promotors in WT-p53- und KO-p53-Zellen. Die HCT116 p53 +/+ und -/- Zellen wurden für 48 h transient mit Kontroll- sowie gegen TRAIL-R2 gerichteter siRNA transfiziert. Darauf folgte für weitere 24 h die Transfektion mit den Luziferasegen-gekoppelten miR-200c-Promotoren. Verwendet wurden hierbei miR-200c-Promotoren, die jeweils p53-Bindungsstellen und entweder vorhandene (F1p717) oder entfernte (F1p736) ZEB-Bindungsstellen vorwiesen. Die mittels Luminometer gemessenen Werte stellen Mittelwerte + Standardabweichung einer Versuchsreihe als repräsentativen Versuch dar.

Diskussion

4.1 TRAIL-2 beeinflusst das Tumorsuppressorprotein p53

4.1.1 TRAIL-R2 und das Tumorsuppressorprotein p53 kolokalisieren im Zellkern

Neben der bekannten Tatsache, dass p53 im Zellkern vorkommt¹⁰⁴, konnte gezeigt werden, dass dies ebenfalls für den TRAIL-R2 gilt⁶⁵ und dass der Todesrezeptor eines der transkriptionellen Zielgene von p53 darstellt¹⁶. Nun ergab sich die Fragestellung, ob auch umgekehrt das Vorhandensein des TRAIL-R2 einen Einfluss auf das Tumorsuppressorprotein hat bzw. beide Proteine miteinander interagieren, wozu die intrazelluläre Distribution beider Proteine untersucht wurde. Hierfür konnte zunächst anhand der Immunfluoreszenzfärbungen mit den kolorektalen Zelllinie HCT 116 in der WT-p53-Form gezeigt werden, dass beide Proteine in der Tat kolokalisierend im Zellkern vorliegen (Abbildung 12 a u. c). Durch die Auswertung der Hochdurchsatzmikroskopie (ImageStream®) ließ sich das Ergebnis einerseits reproduzieren sowie zusätzlich quantifizieren, sodass in 62% der gesamten untersuchten Zellen der TRAIL-R2 mit dem Tumorsuppressorprotein p53 im Zellkern kolokalisiert (Abbildung 12 b). Dass nicht 100% der Zellen eine Interaktion der beiden untersuchten Faktoren zeigen, könnte dadurch erklärbar sein, dass sowohl TRAIL-R2 als auch p53 in ein komplexes Netzwerk aus molekularen Signalketten verwickelt sind. P53 steht, wie bereits erwähnt, unter ständigem hemmenden sowie degradierenden Einfluss des negativen Regulators MDM2¹⁰⁵. Ein Teil des p53, welcher zum Zeitpunkt der Untersuchung in den Zellen nicht an TRAIL-R2 gebunden vorlag, könnte mit anderen Proteinen komplexiert haben und daher einem Nachweis der Kolokalisation entgangen sein. Zudem ist für TRAIL-R2 sowie p53 bekannt, dass sie mit den Proteinen des Mikroprozessorkomplexes im Zellkern interagieren und an der Reifung von miRNAs beteiligt sind^{65,106}. Da in der vorliegenden Arbeit primär die Interaktion zwischen TRAIL-R2 und p53 eruiert werden sollte, wurden keine weiteren Färbungen gegen etwaige andere Proteine durchgeführt, mit denen gleichzeitig eine Kolokalisation im Kern möglich sein könnte und wodurch eine nicht hundertprozentige Kolokalisation beider Proteine in allen Zellen erklärt wäre. Interessanterweise ist beschrieben worden, dass der TRAIL-R2 in malignen Geweben vermehrt exprimiert

wird und diese erhöhte Expression mit einer schlechteren Prognose für die Patienten einhergeht^{101,107–109}. Es wird daher davon ausgegangen, dass Tumorzellen den TRAIL-R2 zum Überleben brauchen bzw. durch diesen einen Überlebensvorteil erhalten. Bisher ist keine Zelllinie mit TRAIL-R2-Knockout bekannt und konnte auch in unserer Arbeitsgruppe bisher nicht etabliert werden. Dadurch entfiel die Möglichkeit, genauere Kontrollen durchzuführen, ob der TRAIL-R2-Antikörper fälschlicherweise den Tumorsuppressor p53 erkannt hat. Entgegen dieser Annahme sprechen allerdings die Bereiche in den Färbungen, in denen jeweils p53 und TRAIL-R2 getrennt voneinander vorliegen. Würde der anti-TRAIL-R2-Antikörper irrtümlicherweise p53 binden, würden wir keine einzeln vorliegenden Proteinfärbungen erwarten. Zusammengefasst kann dies als Anhaltspunkt genutzt werden, dass die Ergebnisse nicht aufgrund einer Kreuzreaktivität des anti-TRAIL-R2-Antikörpers zustande gekommen sind (Abbildung 12 a u. c). Zur weiteren Verifizierung wurde die Immunfluoreszenzanalyse unter Verwendung verschiedener Antikörper gegen TRAIL-R2 (HS201 und Lexatumumab) sowie gegen p53 (FL393 und DO-1) wiederholt (Abbildung 12 c). Zu sehen ist erneut durch Überlagerung der Einzelfärbungen ein Bild, in denen die gelben Spots die Orte der Kolo-kalisation zwischen TRAIL-R2 und p53 darstellen. Eine derart enge räumliche Nähe kann bereits hinreichend dahingehend interpretiert werden, dass beide Proteine nicht nur räumlich zusammen im Zellkern vorliegen, sondern auch direkt miteinander interagieren. Um dennoch mögliche Fehlerquellen auszuschließen, wurden die Versuche unter alleiniger Verwendung der sekundären Antikörper wiederholt. Hierunter waren keine Signale erkennbar, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die sekundären Antikörper jeweils spezifisch gebunden haben (Abbildung 12 b). Die Färbungen wurden als weiterer Versuchsansatz mit den HCT 116 p53^{-/-} Zellen wiederholt. Auch so zeigten sich keine Signale einer Kolo-kalisation, sodass mögliche falsch positive Ergebnisse aufgrund einer Kreuzreaktivität des anti-p53-Antikörpers mit TRAIL-R2 ausgeschlossen werden können (Abbildung 13). Zuletzt sollte analysiert werden, ob es zudem ein gleichzeitiges Vorkommen von TRAIL-R1 und p53 im Zellkern gibt, wofür die Immunfluoreszenzanalysen mit dem TRAIL-R1-spezifischen Antikörper Mapatumumab durchgeführt wurden. Es zeigten sich keine Bereiche, in denen beide Proteine kolo-kalisieren. Dafür ist die intrazelluläre Verteilung beider Proteine erkennbar: TRAIL-R1 befindet sich auf der Zellmembran sowie im Zytoplasma und p53 im Zellkern (Abbildung 12 a). Dass der TRAIL-R1 neben seiner plasmamembrangebundenen Lokalisation zu großen Teilen auch im Zytoplasma vorkommt, ist bereits bekannt^{64,65}. Es gibt jedoch auch Beschreibungen, dass TRAIL-R1 zu 12 % im Nukleus

von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom-Zellen lokalisiert ist ^{62,110}. In den vorliegenden Versuchen ließ sich jedoch eine Kolo-kalisation zwischen TRAIL-R1 und p53 nicht nachweisen. Eine weitere Frage wäre jedoch zudem, ob die Lokalisation der TRAIL-Rezeptoren von der Krebsentität per sé abhängig ist und dadurch jeweils differente Vorteile für die unterschiedlichen Zellgruppen mit sich bringt. Dies erfordert, die Versuche mit anderen Krebszelllinien zu wiederholen.

Um die intranukleäre Interaktion zwischen TRAIL-R2 und p53 zu verifizieren, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Dieses Verfahren ermöglichte uns herauszufinden, ob beide Proteine in einem Proteinkomplex vorkommen. Dafür wurden der TRAIL-R2 mit HS201 sowie Lexatumumab und p53 mit DO-1 präzipitiert. Zudem erfolgte die Präzipitation des TRAIL-R1 mit HS101 und Mapatumumab. Die Analyse der Immunpräzipitate erfolgte anschließend per Western Blot Analyse. Für die Versuche wurden Kernlysate aus den HCT 116 p53 +/+ Zellen verwendet, die zuvor keine Behandlung mittels Chemotherapeutikum oder Hemmung von MDM2 zur stärkeren p53-Aktivierung erfahren haben. Daher sind alle Ergebnisse aufgrund der alleinigen Anwesenheit des Tumorsuppressorproteins zu werten (Abbildung 15 a und b). In den Abbildungen zu sehen ist, dass bei den Präzipitationen mit HS201 und Lexatumumab p53 deutlich mit-präzipitiert wurde. Die Sensitivität der stattgefundenen Komplexbildung kann durch die Verwendung zweier Antikörper als erhöht betrachtet werden. Zusätzlich stand erneut die Frage im Raum, ob die Ergebnisse aufgrund einer Kreuzreaktivität der anti-TRAIL-R2-Antikörper mit dem p53-Protein zustande gekommen sein könnten. Da für die Experimente, wie bereits erwähnt, jedoch keine Knockout-TRAIL-R2-Zellen vorhanden waren, bedienten wir uns eines anderen Verfahrens: In einer der eigentlichen IP vorangestellten „Vor-Immunpräzipitation“ wurde mithilfe eines spezifischen Antikörpers TRAIL-R2 aus den Lysaten entfernt. Im Western Blot ist zu sehen, dass dieser Vorgang erfolgreich ablief (Abbildung 15 a) und so die TRAIL-R2-depletierten Lysate zum Vergleich zu den nicht veränderten Lysaten für die eigentliche Immunpräzipitation eingesetzt werden konnten. Interessanterweise ist in der finalen Analyse eindeutig erkennbar, dass es in den ursprünglichen, also TRAIL-R2-enthaltenen Zellen zu einer Komplexbildung mit dem p53-Protein kommt, wohingegen dieses, in den TRAIL-R2-deletierten Zellen nicht mehr mit präzipitiert wird (Abbildung 15 a). Des Weiteren konnte der Tumorsuppressor auch mit keinem der TRAIL-R1-spezifischen Antikörper ko-präzipitiert werden. Dies stützt die bisherigen Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalyse, dass keine Interaktion zwischen Trail-R1 und p53 in den untersuchten Zelllinien stattgefunden hat. Auch wenn

bereits beschrieben wurde, dass es in verschiedenen Krebszellen zu einer p53-abhängigen Heraufregulation des TRAIL-R1 kommen kann¹⁵, können die Resultate dieser Arbeit dies für den Nukleus bisher nicht bestätigen. Die Ergebnisse beider Versuchsaufbauten sprechen zusammengenommen für eine Interaktion des TRAIL-R2 mit p53 im Zellkern und lassen vermuten, dass es dadurch auch eine funktionelle Beeinflussung gibt. In weiteren Daten unserer Arbeitsgruppe konnte auch mit einer anderen Zelllinie die besagte Interaktion nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um die temperatursensitive Form von ASPC-1-Zellen, die eine höhere Menge an p53 und TRAIL-R2 exprimieren als die kolorektalen HCT 116 p53 +/+ Zellen und aufgrund dessen eine effizientere Präzipitation erlauben¹¹¹. Dies bestätigt zudem eine Interaktion beider Proteine in verschiedenen Krebsentitäten. Ob diese Interaktion in einer direkten oder indirekten Protein-Protein-Verbindung begründet liegt, erfordert weitere Untersuchungen.

Für die beiden TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 ist hinreichend beschrieben, dass sie in den Zellkernen verschiedener maligner Zellen zu Komplexen zusammengelagert sind und interagieren⁶⁴ sowie bei einer Erbgutschädigung in WT-p53-Zellen vermehrt exprimiert werden^{16,112}. Überdies ist für den TRAIL-R4, der eine anti-apoptotische Funktion ausführt, herausgefunden worden, dass dieser spezifisch heteromere Komplexe mit dem TRAIL-R2 bilden kann¹¹³. Denkbar wäre nun aufgrund der genannten Überschneidungspunkte ebenfalls die Vermutung, dass einerseits der TRAIL-R1 aber auch der TRAIL-R4 Einfluss auf die intranukleären Funktionen des TRAIL-R2 und damit genauso auf dessen Interaktion mit dem p53-Protein nehmen. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen bisher jedoch dafür, dass p53 und TRAIL-R1 zumindest in der WT-p53-exprimierenden kolorektalen Zelllinie HCT 116 nicht interagieren. Eine Behandlung der Zellen mit einem Chemotherapeutikum oder Hemmung des MDM2 (z.B. mit Nutlin-3), um eine höhere Expression von p53 zu induzieren, sodass keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob die Interaktion zwischen TRAIL-R1 und p53 aufgrund möglicher anderer, konkurrierender Bindungspartner erst ab einer bestimmten Konzentration des p53-Proteins zustande kommen kann. Ebenso wurde eine mögliche Interaktion mit dem TRAIL-R4 in dieser Arbeit nicht untersucht. Den vielen Einflussfaktoren könnte zuerst nachgegangen werden, indem man eine Erweiterung der bisherigen Immunpräzipitationen durchführt. TRAIL-R1 und -R4 würden transient herunterreguliert und mit unbehandelten Zellen nach Präzipitation des TRAIL-R2 präzipitiert verglichen werden. So würde eine mögliche Komplexbildung zwischen den jeweiligen Proteinen sowie Unterschiede je nach vorhandenem oder gehemmtem TRAIL-

R1 bzw. -R4 sichtbar werden und anschließend, bei positiven Ergebnissen, erneut der Einfluss einer TRAIL-R2-Hemmung auf die möglichen Interaktionen ein genaueres Verständnis des komplexen Netzwerks zwischen den Todesrezeptoren und dem Tumorsuppressorprotein erbringen.

4.1.2 Die Hemmung des TRAIL-R2 führt zu einer gesteigerten Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53

Wie schon erwähnt, ist es bekannt, dass eine Aktivierung von p53 zu einer vermehrten Expression des TRAIL-R2 führt. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Kollokalisierung der beiden Proteine im Zellkern war die Frage auf, ob TRAIL-R2 einen direkten Einfluss auf p53 ausübt und damit seine Funktion beeinflusst. Dazu wurde in WT-p53-Zellen der TRAIL-R2 transient herunterreguliert und die Aktivität von p53 mittels käuflich erworbenem Assay analysiert. Hierbei führte der Rezeptorknockdown unter Verwendung zweier verschiedener siRNAs gegen TRAIL-R2 zu einer Steigerung der p53-Aktivität. Zur Kontrolle sowie um eine Einschätzung zu erhalten, welche Wertigkeit dieser Anstieg besitzt, wurden parallel unbehandelte sowie mit 5-FU behandelte HCT 116 p53 +/+ Zellen untersucht. Das Chemotherapeutikum führt zu einer Aktivierung von WT p53¹¹⁴, sodass sich im Vergleich zu den unbehandelten Zellen wie erwartet ein deutlicher Anstieg der Tumorsuppressoraktivität nach Behandlung zeigt. Absolut gesehen, zeigt sich dieser Anstieg in den mit 5-FU behandelten Zellen größer, als in denen mit R2-Knockdown, weswegen es interessant wäre zu schauen, ob eine Kombination beider Faktoren, also eine gleichzeitige Rezeptorhemmung sowie eine 5-FU-Behandlung in WT-p53-Zellen, zu einer noch intensivierten Aktivitätsvermehrung des Tumorsuppressors führen könnte. Diesem Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nachgegangen. Außerdem fanden keine weiteren Zelllinien als die HCT 116 p53 +/+ Zellen Verwendung für die Aktivitätsassays, sodass keine Aussagen darüber getroffen werden können, ob es unterschiedliche Ausprägungen in verschiedenen WT-p53-exprimierenden Krebszellen gibt. Zuletzt wurde in diesem Versuch der TRAIL-R2 für 48 h transient herunterreguliert. Da bekannt ist, dass der negative Regulator MDM2 zügig nach p53-Hochregulation aktiv wird⁴, könnte geschaut werden, ob auf der einen Seite ein Knockdown des TRAIL-R2 für kürzere Zeit ebenso effektiv bezüglich der p53-Aktivierung ist und ob auf der anderen Seite eine Behandlung mit Nutlin-3 zur Blockade von MDM2 diesen Effekt zusätzlich potenziert.

4.2 Der TRAIL-2-Rezeptor beeinflusst das Tumorsuppressorprotein p53 in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor

4.2.1 Der Knockdown des TRAIL-R2 verursacht eine vermehrte Expression der proteinkodierenden Zielgene des Tumorsuppressorproteins p53

Aufgrund des Nachweises der erhöhten p53-Aktivität unter Knockdown des TRAIL-r2, ergab sich der Ansatz zu untersuchen, ob TRAIL-R2 auch die Eigenschaft von p53 als Transkriptionsfaktor beeinflusst. Hierfür wurde die Expression von Protein-kodierenden Genen untersucht, die direkt durch p53 reguliert werden. Stellvertretend wurden hier p21/WAF1, BAX sowie MDM2 gewählt, da diese in ihrer Funktion sowie ihrem Zusammenhang mit p53 allesamt gut untersucht sind. Für die Analysen wurde in HCT 116 p53 +/+ sowie -/- Zellen der Trail-R2 herunterreguliert und die Expression der genannten Gene im Western Blot untersucht. Die in Abbildung 13 abgebildeten Banden bei einer Größe von 40 kDa und 48 - 50 kDa stellen die zwei aus Spleißvorgängen hervorgehenden Isoformen des TRAIL-R2 dar, die bereits beschrieben wurden³⁶. Die kleinere der beiden wird durch die siRNA vollständig herunterreguliert, die als Doppelbande vorliegende größere Form hingegen deutlich schwächer.

Man sieht in den WT-Zellen, dass eine verminderte Expression von TRAIL-R2 zu einer Expressionszunahme von p53 führt. Bisher ist beschrieben, dass WT-p53 zu einer Hochregulation der TRAIL-R2-Genaktivität führt, da dieser über mehrere p53-Bindungsstellen verfügt¹¹⁵. Die von uns hier dargestellte inverse Beeinflussung seitens des TRAIL-R2-Status auf p53 ist hingegen bisher nicht bekannt. Da, wie bereits beschrieben, der TRAIL-R2 je nachdem, in welchem Zellkompartiment er vorliegt, unterschiedliche Aufgaben erfüllt, könnte sich hierdurch ein komplexes molekulares Netzwerk ergeben.

Der Inhibitor von p53, MDM2, wird bei verminderter TRAIL-R2-Expression ebenfalls hochreguliert. Dieser Effekt ist in den Wildtyp- aber auch in den p53-Knockout-Zellen sichtbar, wobei er unter Anwesenheit von p53 stärker ausfällt. Wie in der Einleitung erwähnt, besteht zwischen p53 und MDM2 eine negative Feedbackhemmung⁷⁴. Bisher wurde zudem gezeigt, dass es unter Nutlin-3 zu einer Inhibition der Interaktion von MDM2 und p53 sowie folglich zu einer gesteigerten Aktivierung von WT p53 und ebenfalls zu einer vermehrten Expression von TRAIL-R2 führen kann¹¹⁶. Die Ergebnisse zeigen hier jedoch, dass die Hochregulation des MDM2 nicht nur wie bisher bekannt aufgrund von Zellstress stattfindet, sondern auch aufgrund einer TRAIL-R2-Hemmung zu dieser führt. Allerdings wurden auch p53-unabhängige Funktionen von

MDM2 gefunden – eine weitreichende Erkenntnis, die u.a. als Erklärung dafür genutzt wird, dass in p53-KO Mäusen eine MDM2-Überexpression vorliegt und damit eine Tumorentstehung sowie -progression vorantreibt ¹¹⁷. So könnte die in dem vorliegenden Versuch vermehrte MDM2-Expression ein p53-unabhängiger direkter Effekt der Todesrezeptorhemmung sein. Stützen würde diese Theorie, dass auch in den KO-p53-Zellen das gleiche Ergebnis unter TRAIL-R2-Knockdown zu erzielen ist, der jedoch in seiner Intensität schwächer ausfällt. Dieser Effekt könnte an dem Vorkommen zweier weiterer Familienmitglieder der p53-Proteinfamilie begründet sein, auf die sich der Trail-R2-Knockdown auswirkt. Hierzu gehören p63 sowie p73, die deutliche strukturelle als auch einige funktionelle Übereinstimmungsmerkmale mit dem p53-Tumorsuppressorprotein aufweisen und als verschiedene Protein-Isoformen aus alternativen Spleißvorgängen generiert werden ¹¹⁸. So ist bekannt, dass sie eine Rolle für Differenzierungs- und Entwicklungsvorgänge sowie der Induktion des programmierten Zelltodes spielen, indem sie ebenso wie p53 als Transkriptionsfaktoren regulierend auf die Expression von Genen einwirken ^{119,120}. Neuere Daten schreiben p63 und p73 breitere tumorsuppressive Funktionen zu, als bisher angenommen ¹²¹.

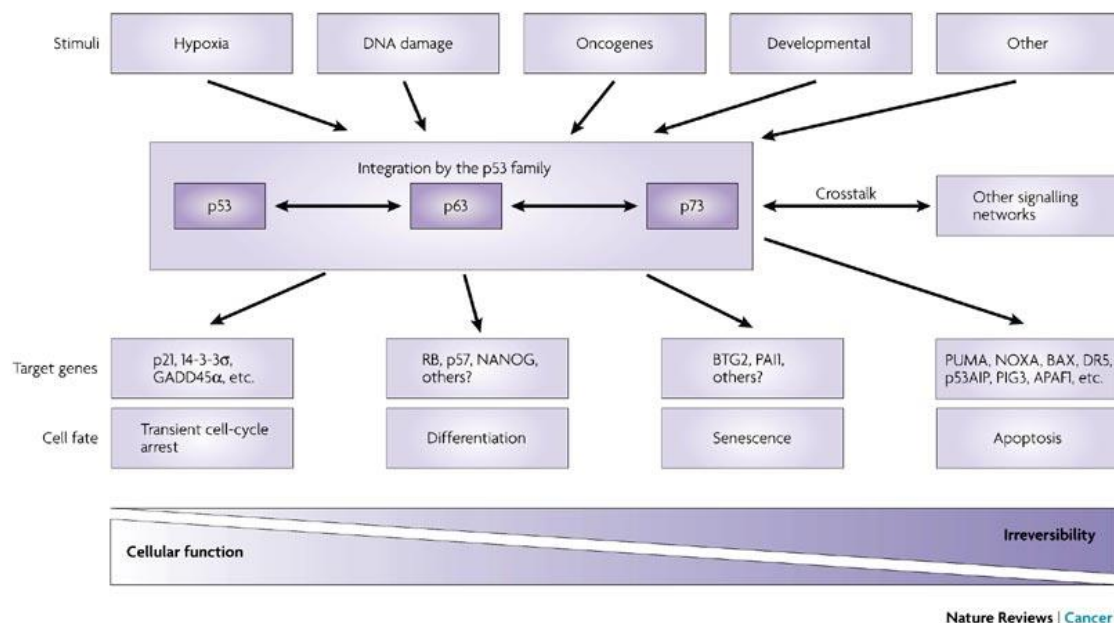


Abbildung 28: Die pleiotrope Wirkung von Mitgliedern der p53-Familie (Stiewe, 2007 ¹²²). Dargestellt ist eine Übersicht der verschiedenen Ursachen, die zu einer Aktivierung der Tumorsuppressorproteine p53, p63 und p73 führen können, als auch die dann ausgelösten Programme. Je nach angesteuertem und reguliertem Zielprotein kann der reversible oder irreversible Zellzyklusarrest sowie der programmierte Zelltod ausgelöst werden. Das System gewinnt an Komplexität durch eine Interaktion mit anderen zellulären Signalkreisen (hier nicht weiter

aufgeführt). *APAF1: apoptotic peptidase activating factor 1; GADD45- α : growth arrest and DNA-damage-inducible- α ; RB1: retinoblastoma susceptibility protein; PAI1: plasminogen activator inhibitor type I; PIG3: p53-induced gene 3 protein.*

Für p73 ist bekannt, dass es mit MDM2 interagieren und von diesem in seinen Funktionen ausgebremst werden kann. Zu einer Degradierung des Proteins, wie es bei einer MDM2-p53-Interaktion resultiert, kommt es nicht¹²³. Einerseits bedingt eine gesteigerte p53-Expression unter Herunterregulation von TRAIL-R2 eine vermehrte Expression der p53-Zielgene, darunter auch MDM2. Jedoch könnte das Vorliegen von p73 und eventuell das von p63 bedingen, dass es p53-unabhängig zu einer Interaktion der Proteine mit MDM2 kommt, wodurch eine weitere Möglichkeit der gesteigerten Expression von MDM2 unter TRAIL-R2-Hemmung begründet wäre. Auch BAX und p21 werden ebenfalls stärker exprimiert, sobald der TRAIL-R2 gehemmt wird. Dieser Effekt ist in den KO-p53 HCT 116 Zellen nicht zu sehen. Zu beachten ist hierbei jedoch die Komplexität, dass auch wenn p63 und p73 an viele der bekannten p53-Targets binden, diese Zielproteine unterschiedlich auf die verschiedenen Tumorsuppressoren reagieren^{124,125}.

Als Kontrollversuch wurde die Transfektion unter Verwendung einer anderen siRNA wiederholt und um die Herunterregulation des TRAIL-R1 erweitert. Hiermit sollte sichergestellt werden, dass sich die Expressionsänderung der p53-Targetgene spezifisch durch den TRAIL-R2-Knockdown erklären lässt. Auch mit der zweiten siRNA führt die Hemmung des TRAIL-R2 zu einer Expressionszunahme von p21. Allerdings sieht man dieses Resultat ebenfalls beim gehemmten TRAIL-R1, auch wenn dies sehr schwach ausfällt. Betrachtet man jedoch die Ladekontrolle des β -Aktins ist ersichtlich, dass in der Kontrolle mehr Protein aufgetragen wurde, als in der Probe mit herunterreguliertem TRAIL-R1. So kann man das schwach erhöhte p21 eher auf diese Ungleichheit der Probenkonzentration zurückführen. In ähnlichen Experimenten, die hier nicht aufgezeigt sind, konnte ein TRAIL-R1-spezifischer Effekt auf p53 und dessen Targets nicht reproduziert werden.

4.2.2 Die Herunterregulation des TRAIL-R2 führt zu einer p53-abhängigen, TRAIL-unabhängigen Aktivierung des p21-Promotors

Bezogen auf die Fragestellung, welchen Einfluss der TRAIL-R2-Status auf p53 in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor ausübt, wurden p21-Promotoraktivitäts-Assays durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse im Western Blot und der Tatsache, dass p21 eines der am stärksten p53-responsiven Zielgene darstellt, wurde dies in Vertretung anderer Targets für die Versuche ausgewählt. Zur Verfügung standen Plasmide mit klonierten p21-Promotorsequenzen mit und ohne p53-Bindungsstellen, wodurch die p53-Abhängigkeit der Ergebnisse eruiert werden konnte.

Das erste Assay zeigt, dass ein Knockdown von TRAIL-R2 zu einer deutlichen Erhöhung der p21-Promotoraktivität führt. Dieser Effekt schwindet wieder, wenn man die zweite unter Belassung der ersten p53-Bindungsstelle entfernt. Zudem ist zu sehen, dass es unter Verwendung des Promotors ohne mit beiden deletierten p53-Bindungsstellen kein Unterschied zwischen der Kontrolle und der Rezeptorhemmung mehr zu verzeichnen. Dies spricht für eine p53-Abhängigkeit der Promotoraktivität, die mittels des zweiten Versuchsaufbaus unter Verwendung von KO-p53-Zellen bestätigt werden konnte. Hier zeigt sich erneut die gesteigerte Aktivierung des p21-Promotors unter Knockdown von TRAIL-R2 – ein Effekt, der mittels Promotor mit beiden deletierten p53-Bindungsstellen nicht mehr zu sehen ist. In den HCT 116 p53 $-/-$ Zellen sieht man keine gesteigerte Promotoraktivität nach TRAIL-R2-Knockdown, sodass von einer p53-Abhängigkeit der Resultate ausgegangen werden kann. Allerdings fällt auch eine basale Promotoraktivität in HCT 116 p53 $-/-$ Zellen auf, die mit dem p21-Promotor transfiziert wurden, der Bindungsstellen für TP53 trägt. Entfernt man diese aus dem Promotorkonstrukt sinkt auch die Aktivität ähnlich zu den WT-p53 Zellen. Dieser p53-unabhängige Effekt könnte erneut auf die Funktionen der weiteren Mitglieder der Tumorsuppressorfamilie zurückzuführen sein. Bestätigt werden konnte diese funktionelle Beziehung mittels CHIP-Analysen in A549 TRAIL-R2-KO-Zellen¹¹¹. Diese Ergebnisse implizieren, dass TRAIL-R2 Einfluss auf das p53-Proteinlevel und damit auch auf das transkriptionelle Ergebnis hat.

Des Weiteren gibt es Berichte über eine Regulation von p53-Zielgenen durch p73. Hierunter fällt auch der Zellzyklusinhibitor p21, der durch p73 induziert werden kann ^{124,126}. Nicht mit dieser These einhergehend steht eine Isoform von p63, für die herausgefunden wurde, dass sie in humanen Keratinozyten eine p21-Promotoraktivität unterdrücken kann und damit als Transkriptionsrepressor fungiert, sofern p53-Bindungsstellen vorhanden sind ¹²⁷. Jedoch

könnte p73 allein für die p53-unabhängige Steigerung der p21-Promotoraktivität verantwortlich sein. Wenn diese Annahme richtig ist, käme zudem die Frage auf, warum der p53-getriggerte Effekt auf den p21-Promotor eine wesentlich höhere Aktivierung dessen mit sich bringt, als von p73. Erklärend hierfür könnte sein, dass eine wesentlich höhere Bindungsaffinität zwischen p53 und dem p21-Promotor oder p21 generell als zwischen p73 und dem p21-Promotor besteht.

Des Weiteren wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem WT-p53 HCT 116 Zellen erneut mit den p21-Konstrukten mit und ohne p53-Bindungsstellen transfiziert und zusätzlich mit einem neutralisierenden Antikörper gegen TRAIL zur Hemmung der Wirkung des endogenen TRAIL behandelt wurden. Hierbei zeigt sich, dass TRAIL keinen Einfluss auf die p53-abhängige Aktivierung des p21-Promotors ausübt, da, wie zu sehen ist, keine Veränderung zur Kontrolle in den Zellen auftritt, die mit anti-TRAIL versetzt wurden. Der promotoraktivitätssteigernde Effekt durch herunterregulierten TRAIL-R2 ist auch hier zu reproduzieren gewesen. Wenn man nun die KO-p53-Zellen betrachtet, so zeigt sich erneut eine schwache, aber vorhandene p21-Promotoraktivität. Inwieweit sich diese Ergebnisse auch auf p63 und/oder p73 übertragen lassen, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht, da die Auswirkungen des Todesrezeptors 2 auf Funktionen von p53 die primäre Fragestellung darstellte. Allerdings besteht eine große Wichtigkeit auch hier weitere Forschung anzutreiben, da bereits beschrieben wurde, dass p53 bei einem DNA-schädigenden Ereignis den programmierten Zelltod nicht auszulösen vermag, wenn p63 sowie p73 abwesend sind¹²⁸. Dies weist auf eine bedeutende funktionelle Verknüpfung der Familienmitglieder hin und könnte auch Auswirkungen auf die TRAIL-R2-p53-Interaktion haben.

4.3 Der TRAIL-2-Rezeptorstatus beeinflusst die p53-abhängige Regulation von Proliferation sowie epidermaler-mesenchymaler Transition

Epidermale-mesenchymale Transition ist, wie in der Einleitung bereits erwähnt, ein zentrales Element während der Embryonalentwicklung, aber auch der Tumorprogression und -metastasierung^{82,86}.

Interessanterweise wurde in den letzten Jahren herausgefunden, dass p53 nicht nur proteinkodierende Gene, sondern auch nicht-kodierende RNAs reguliert. Hierunter fällt auch die Familie der miR-200: p53 kann aufgrund von Bindungsstellen innerhalb der Promotoren die

Gene der beiden miR-200-Cluster mir-200c/141 und mir-200a/200b/429 transkriptionell regulieren und damit zu einer Expressionszunahme dieser führen. Als Resultat werden die EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren ZEB1 und -2 von den p53-aktivierten miR-200-Familienmitgliedern gehemmt^{103,129}. Von großer Bedeutung für die vorliegende Arbeit war es daher, dass das EMT-Netzwerk zwischen Mitgliedern der miR-200- und ZEB-Familie einen weiteren beeinflussenden Faktor, nämlich das Tumorsuppressorprotein p53, erhält und dass sich der TRAIL-R2-Status auch hier auswirken könnte.

4.3.1 Die Hemmung des TRAIL-R2 führt zu einer gesteigerten Expression der miR-200-Familie

Da wir zeigen konnten, dass die Aktivität und Funktion von p53 durch den TRAIL-R2 beeinflusst sowie gesteuert werden kann, liegt die Vermutung nahe, dass der induzierende Effekt von p53 auf das Expressionslevel der miRNA-200-Familie sich ändert, sobald sich der TRAIL-R2-Status ändert. Hierzu wurde der Rezeptor in HCT 116 p53 +/+ Zellen transient herunterreguliert, deren RNA isoliert und anschließend die Menge der vorkommenden miRNA-200 untersucht. Aufgezeigt sind die Ergebnisse für die miR-200a sowie -141. Bei beiden führt eine Hemmung des TRAIL-R2 in den WT-p53-Zellen in der Tat zu einer Steigerung der miRNA-Expression, wobei diese bei miR-141 ausgeprägter als bei der miR-200a ausfällt. Ersichtlich ist auch der Unterschied des relativen Expressionslevels, welches bei der miR-141 höher liegt als bei miR-200c. Dies könnte darauf hindeuten, dass unterschiedliche Muster und Mengen an miRNAs vorliegen können, die je nach Funktion für die Zelle brauchbar sein könnten. Allerdings ist für die Berechnungen herausgekommen, dass die Ergebnisse innerhalb der WT-p53-Gruppe nicht signifikant sind. Überraschend ist demgegenüber das Resultat in den HCT 116 p53 -/- Zellen, welches im Gegensatz zu den WT-p53-Proben eine hohe Signifikanz aufweist. Betrachtete man das Expressionslevel der miR-141, liegt dieses in den Kontrollzellen (Ksi) bereits deutlich über dem Level, welches in den WT-p53-Zellen durch TRAIL-R2-Hemmung (R2si) gesteigert wird. Auch bezüglich der miR-200a kommen wir zu einem entsprechenden Ergebnis: In den p53-deletierten Zellen liegt das miRNA-Expressionslevel der Kontrolle deutlich über dem der WT-p53-Kontrollzellen sowie annähernd so hoch wie das Level der TRAIL-R2-herunterregulierten Variante. Wird der TRAIL-R2 nun in den KO-p53-Zellen gehemmt, verringert sich die miR-200a- und miR-141-Expression wieder, wobei das Level unter diesen Umständen nicht unter das der Kontrolle der HCT 116 p53 +/+ Zellen sinkt. Dass in KO-p53-Zellen auch eine Expression sowie

Regulierung der untersuchten miR-200-Familie stattfindet, könnte erneut an der Beteiligung von p63 sowie p73 liegen. Für diese konnte gezeigt werden, dass sie die Transkription von miRNAs, darunter auch die miR-200-Familie, aufgrund von Bindungsstellen in den Promotoren als auch durch Interaktion mit den Proteinen des Mikroprozessorkomplexes, steuern können ^{130,131}.

4.3.2 Die Hemmung des TRAIL-R2 beeinflusst in WT-p53-Zellen die zentral EMT-regulierenden Proteine E-Cadherin und ZEB1

E-Cadherin spielt eine tragende Rolle in der Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten, der Erhaltung der Zellpolarität sowie im Rahmen der Zelldifferenzierung. Eine Inaktivierung oder der Verlust von E-Cadherin führt in diesem Zusammenhang zum Auflösen von Zell-Zell-Haftung und über eine Aktivierung des EMT-Programms zu einer malignen Entartung sowie Tumorprogression aufgrund von Umwandlung bereits differenzierter Epithelzellen in undifferenzierte mesenchymale Stammzellen. Als Inhibitor von E-Cadherin sowie miRNAs verhält sich ZEB1 als Induktor der epithelial-mesenchymalen Transition malignitätsfördernd ¹³².

Aufgrund der bedeutenden Stellung für Entartung, Tumorprogression sowie Metastasierung, sollten diese zwei zentralen EMT-regulierenden Proteine in Bezug auf die Zusammenhänge zwischen dem TRAIL-R2 und p53 mithilfe von Western-Blot-Analyse untersucht werden. Der zur Kontrolle untersuchte TRAIL-R2 zeigt, dass der Rezeptorknockdown in beiden Proben ausreichend stattgefunden hat. Zudem erkennt man, dass die Hemmung des TRAIL-R2 in den WT-p53-Zellen zu einer Steigerung der E-Cadherin- sowie gleichzeitig zu einer Senkung der ZEB1-Expression führt. Dies ist übereinstimmend mit den bisherigen Ergebnissen, bei denen eine Hemmung des TRAIL-R2 zu einer erhöhten p53-Aktivierung führt. Folglich kann es nun in Bezug auf die epitheliale-mesenchymale Transition zu einer Expressionssteigerung der miR-200-Familie kommen, welche sodann EMT-fördernde Proteine wie das vorliegende ZEB1 herunterregulieren und gleichzeitig Proteine wie E-Cadherin, die eine mesenchymal-epitheliale Transition fördern, stärker aktivieren. Betrachtet man nun die Ergebnisse in den KO-p53-Zellen, scheint keine relevante Änderung von E-Cadherin nach TRAIL-R2-Hemmung aufzutreten. Es wurde beschrieben, dass E-Cadherin eine Zusammenlagerung der TRAIL-Rezeptoren 1 sowie 2 als auch die Formung des DISC fördert. Hierüber würden epitheliale Tumorzellen eine höhere Sensitivität bezüglich einer TRAIL-R1-/R2-vermittelten Apoptose erlangen ¹³³. Da E-Cad-

herin wichtig für die TRAIL-R2-vermittelte Apoptose ist und E-Cadherin- sowie p53-Mutationen Auswirkungen auf die Proliferation von Tumorzellen haben, wären weitere Untersuchungen bezüglich der Interaktion unter Einbezug von E-Cadherin denkbar. Des Weiteren scheint die ZEB1-Expression ebenfalls dezent vermindert zu sein, jedoch könnte dies an einer ungleichen Proteinbeladung liegen, da das β -Aktin der Kontrolle zu dem des Rezeptorknockdowns stärker ausfällt und es in den HCT 116 p53 $-/-$ Zellen eigentlich zu keinem Unterschied in der ZEB1-Expression kommt, wenn der Todesrezeptor 2 gehemmt wird. Da jedoch in den WT-p53-Zellen ein deutlicher Effekt zu sehen ist, können wir von einer p53-abhängigen Regulation ausgehen. Das Ergebnis in den HCT 116 p53 $-/-$ Zellen, wenn auch schwächer ausfallend, ließe sich dadurch erklären, dass es weitere Interaktionen aufgrund des großen Netzwerkes an weiteren Faktoren, welche die epidermale-mesenchymale Transition positiv und negativ beeinflussen können, gibt⁸⁷. Ob daher weitere Faktoren Einfluss auf die dargestellten Ergebnisse haben, ist nicht bekannt und dieser Ansatz sowie die anderen beeinflussenden Faktoren wurden in der vorliegenden Arbeit nicht weiterverfolgt.

4.3.3 Die Hemmung des TRAIL-R2 führt zu einer p53-abhängigen Steigerung der miR-200c-Promotoraktivität

Da p53 als Regulator der miR-200-Familie bekannt ist, lag aufgrund der bisherigen Ergebnisse die Vermutung nahe, dass TRAIL-R2 über eine Interaktion mit p53 einen Einfluss auf die miR-200-Induktion nimmt. Zur Überprüfung dieser These wurden miR-200c-Promotor-Aktivitätsassays durchgeführt. In Abbildung 20 sieht man die HCT 116 p53 $+/+$ Zellen, die mit einer Kontroll- sowie einer gegen TRAIL-R2-gerichteten siRNA sowie zwei Promotorkonstrukten transfiziert wurden. Die Ergebnisse stellen den Vergleich zwischen der Kontrolle und dem Rezeptorknockdown dar. Es ist ersichtlich, dass es bei beiden transfizierten Promotorkonstrukten unter TRAIL-R2-Hemmung zu einem Anstieg der miR-200c-Promotoraktivität kommt. P717 besitzt Bindungsstellen für ZEB1, worunter es durch die TRAIL-R2-Hemmung zu einer 1,3-fachen Steigerung der miR-200c-Promotoraktivität kommt. Interessanterweise ist dieser Effekt deutlich ausgeprägter bei dem p736-Promotor, wo sich die Aktivität des miR-200c-Promotors um das 1,8-fache gesteigert zeigt. ZEB1 kann hier aufgrund von deletierten Bindungsstellen nicht mehr an den Promotor binden und dessen Expression regulieren. Dieses Ergebnis zeigt einerseits den bereits bekannten Fakt, dass ZEB1 inhibierend auf Mitglieder der miR-200-Familie wirkt und deren Expression drosselt, andererseits die neue Erkenntnis, dass der TRAIL-

R2 ebenfalls einen hemmenden Einfluss auf die miR-200-Familie auszuüben scheint, da nach einer Herunterregulation des Rezeptors die Aktivität des Promotors steigt. Bisher wurde nur beschrieben, dass TRAIL-R2 eine Hemmung der miRNA let-7 bedingt^{64,65}. Die vorliegenden Ergebnisse implizieren nun auch die Möglichkeit einer Beeinflussung der miRNA-200-Familie durch den TRAIL-R2. Zudem muss bei diesen ersten Resultaten jedoch bedacht werden, dass die verwendeten Promotoren keine Bindungsstellen für p53 besitzen, sodass die Effekte, die bisher zu sehen sind, nicht in Abhängigkeit von p53 gesehen werden können. Um jedoch die Abhängigkeit der Ergebnisse vom p53-Status zu überprüfen, wurden die Assays unter zusätzlicher Verwendung der KO-p53-Zellen sowie weiterer Promotorkonstrukte wiederholt, die Bindungsstellen für den Tumorsuppressor enthielten. Die Abbildung 21 zeigt als erstes die WT p53 Zellen, die mit dem Promotor F1P717 transfiziert wurden. Dieser enthält ZEB1- und p53-Bindungsstellen. Deutlich zu sehen ist die Promotoraktivitätszunahme, wenn der TRAIL-R2 gehemmt wird. Dieser Effekt entspricht dem des ersten Versuchs, zeigt aber auch deutlich eine p53-abhängige zusätzliche Promotoraktivitätssteigerung. Entfernt man nun die ZEB1- unter Belassung der p53-Bindungsstellen, potenziert sich dieser Effekt noch einmal. Damit können wir den Effekt von p53 unter Ausschaltung von ZEB1 auf die miR-200-Familie bestätigen^{92,103} und einen neuen Faktor, nämlich TRAIL-R2, mit einbringen. Um die Abhängigkeit der Ergebnisse von p53 weiter zu verifizieren, erfolgte der gleiche Versuch mit KO-p53-Zellen. Hier zeigt sich, wie im vorherigen Versuch mit den Promotoren ohne p53-Bindungsstelle, zwar eine leichte Promotoraktivitätszunahme, sobald der TRAIL-R2 gehemmt wird und eine noch etwas stärkere, wenn zudem die Bindungsstellen für ZEB1 wegfallen, jedoch fallen diese Veränderungen sehr viel schwächer aus als unter Anwesenheit von p53. Dass wir zudem sowohl eine p53-unabhängige Effektzunahme sehen, sobald der TRAIL-R2 gehemmt wird, sowie zusätzlich, wenn die ZEB1-Bindungsstellen entfernt werden, spricht erstens für eine mögliche Beeinflussung der Funktionen von p63 und p73 durch TRAIL-R2, sowie einen Einfluss dieser beiden Proteine auf ZEB1 und damit vermutlich auf die epidermale-mesenchymale Transition. Da, wie bei den anderen Versuchen erläutert, zu allererst der Einfluss des TRAIL-R2 auf die Funktionen des Tumorsuppressorproteins p53 untersucht werden sollte, wurde dem möglichen Einfluss seiner Familienmitglieder nicht nachgegangen. Zur besseren Beurteilung der p53- und TRAIL-R2-abhängigen EMT-Abläufe könnten weitere Induktoren als auch Inhibitoren wie z.B. Slug, Snail, N-Cadherin oder Vimentin untersucht werden. Letztlich ist es in diesem Zusammenhang

ebenfalls wichtig, ein genaueres Verständnis über die einhergehenden Metastasierungsvorgänge zu erhalten, wozu Untersuchungen notwendig wären, die sich mit dem Migrations- und Invasionsverhalten der Zellen beschäftigen

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Ziel dieser Forschungsarbeit war es herauszufinden, ob und in welchem Ausmaß der TRAIL-R2 das Tumorsuppressorprotein p53 und einhergehend seine weitere Funktion als Transkriptionsfaktor beeinflusst. Obwohl bereits beide Proteine in der Vergangenheit für sich eine wichtige Rolle in der Entwicklung neuer anti-tumoraler Therapien spielten, wurden sie trotz überschneidender Punkte in Hinblick auf synergistische oder antagonistische therapeutische Effekte nicht weiter untersucht. Heutzutage ist bekannt, dass in mehr als 50 % der malignen Tumore eine Mutation des WT p53 vorliegt, die meist mit einem Funktionsverlust dessen einhergehen¹⁹. Zellen können sich dann trotz vorliegender Erbgutschäden ungehindert vermehren und ausbreiten^{134,135}, sowie eine Chemotherapieresistenz entwickeln. Dies ist dadurch erklärbar, dass der Ansatz, aufgrund einer medikamentös-induzierten DNA-Schädigung zu einer Aktivierung von WT p53 zu gelangen und damit ein gezieltes Zellsterben hervorzurufen, mit Vorliegen von Mutationen wegfällt^{3,136}. Bisher galt es daher als plausibel, p53 medikamentös zu (re-)aktivieren^{137,138}. Niedrigere Rezidivraten sowie bessere Prognoseaussichten bestätigten diesen Ansatz als erfolgreich¹³⁹. Auch TRAIL-Rezeptoren waren Ziel eines Ansatzes in der Therapie von Tumoren, da es bei einer ligandenabhängigen Aktivierung der Rezeptoren zu einer selektiven Elimination maligner Zellen ohne gleichzeitige, auf gesundes Gewebe übergreifende Toxizität kommt⁹⁷. Da viele Tumorzellen jedoch Resistenzen gegen TRAIL entwickelten, gelang auch mit diesen Versuchen kein antitumoraler Therapiedurchbruch⁹⁸. P53 kann den plasmamembranständigen als auch den nukleären TRAIL-R2 hochregulieren^{112,140}, während in vielen Tumorzellen bereits höhere Level an TRAIL-R2 (sowie generell TRAIL-Rezeptoren) verzeichnet werden^{141,142}. Wir konnten zeigen, dass p53 im Kern mit dem TRAIL-R2 im Kern interagiert und dass nukleärer TRAIL-R2 die Tumorprogression fördert – diese Erkenntnisse konnte bereits durch weitere Projekte unserer Arbeitsgruppe mit den Wildtyp-p53-exprimierenden Zellen A549 sowie der Pankreastumorzelllinie AsPC-1 und damit einer mutierten p53-Form bestätigt werden¹¹¹. Es konnte beobachtet werden, dass eine Herunterregulation von TRAIL-R2 in HCT 116- und A549-Zellen zu einer Erhöhung des p53-Proteinlevels und darüber hinaus der Expression von p53-Zielgenen, wie z.B. p21, BAX und MDM2, führt. Einhergehend damit folgt einer Überexpression von TRAIL-R2 zu einer Herunterregulation von p53 und seinen Zielgenen.

Zur weiteren Untermauerung des Einflusses von TRAIL-R2 wurden bereits Chromatin Immunpräzipitationen (ChIP) durchgeführt und die Funktion von TRAIL-R2 als negativen endogenen Regulator von p53 bestätigt ¹¹¹. Interessant war es zudem, auf welcher Ebene, z.B. transkriptionell, diese Interaktion geschieht. Auch dies konnte bereits durch unsere Arbeitsgruppe dargelegt werden ¹¹¹. Hier zeigte sich, dass nicht die Transkription, sondern die Stabilität des p53-Proteins beeinflusst wird. Über Einsatz von Nutlin-3a, welches die MDM2-p53-Interaktion inhibiert und damit die Ubiquitinierung von p53 verhindert, konnte eine TRAIL-R2-vermittelte Destabilisierung von p53 unterbunden werden. Umgekehrt bedeutet dies, dass TRAIL-R2 die MDM2-vermittelte Ubiquitinierung von p53 vorantreibt. Eine weitere Entdeckung einhergehender Ergebnisse auch in Zellen, die eine mutierte Form von p53 (AsPC-1) aufweisen, ist dahingehend relevant, da viele Tumorentitäten eine Mutation an p53 tragen ^{17, 135, 143-146}. Durch den aufgezeigten hemmenden Einfluss von nTRAIL-R2 auf das Tumorsuppressorprotein p53, ist bei Vorliegen beider Proteine im Kern Abstand von angenommenen antitumoral- und apoptose-fördernden Auswirkungen zu nehmen. Aufgrund des beschriebenen TRAIL-stimulierten Kerntransports von TRAIL-R2 ¹¹⁰ und der Feststellung, dass nukleärer TRAIL-R protumorale Funktionen besitzt, wurde dieser Ansatz bereits weiterverfolgt, um ein genaueres Verständnis der nukleären Funktionen und Interaktionen von TRAIL-R2 zu bekommen. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der Kernimport von TRAIL-R2 TRAIL- sowie Clathrin-abhängig ist. Zudem zeigten weitere Untersuchungen mittels Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz eine Interaktion von nukleärem TRAIL-R2 und dem nukleärem Exportprotein Exportin-1/CRM-1. Mutationen dieser Exportproteine führen nun zu einer Akkumulation von nTRAIL-R2. Diese Erkenntnisse zeigen interessante therapeutische Ansätze auf, gerade diesen Kernimport zu blockieren oder etwaige Transporter konkurrierend zu besetzen oder Exportproteine höher zu exprimieren, damit es zu keiner Anhäufung von TRAIL-R2 im Kern und damit möglichen Interaktion mit p53 kommen kann. Eine vermehrte TRAIL-R2-Expression könnte sowohl in WT p53-exprimierenden Zellen als auch in denjenigen Krebszellen, in denen in antitumoraler Absicht p53 medikamentös aktiviert wurde, zu einer Unterbindung der Funktion von p53 als Transkriptionsfaktor und miRNA-Regulator führen. Durch den Wegfall der tumorsuppressiven Eigenschaften und gleichzeitig aktivem TRAIL-R2 könnte eine maligne Entartung, Ausbreitung oder Progression zusätzlich vorangetrieben werden. Diese Erkenntnisse sprechen für ein weiteres Therapiekonzept, in denen eine Herunterregulation des nukleären TRAIL-R2

unter Hochregulation von p53 angestrebt werden sollte. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob es durch die Hemmung von TRAIL-R2 zu einem Überwiegen der weiteren TRAIL-Rezeptoren kommt und welche Auswirkung dies auf die Zellen hätte. Zudem ist von Interesse, inwieweit die p53-Familienmitglieder p63 und p73 Einfluss in das komplexe Netzwerk von TRAIL-Rezeptoren und p53 nehmen. Unsere Ergebnisse legen in mehreren Versuchen nahe, dass auch diese beiden Proteine von dem TRAIL-R2 beeinflusst sein könnten. Hierfür müsste dieser Aspekt untersucht werden, bevor er Berücksichtigung in einer Therapieentwicklung finden könnte. Unsere Versuche zeigten zwar unter TRAIL-Stimulation keinerlei Änderung der Ergebnisse, dies wäre bei der weiteren Erforschung und Entwicklung von Therapiemöglichkeiten dennoch dringend zu berücksichtigen, da endogen produziertes TRAIL bei einem Einfluss in die untersuchten Regelkreisläufe eine mögliche Therapie abschwächen oder funktionslos machen könnte.

Insgesamt zeigen sich so viele Ansatzpunkte für weitere Forschungsmaßnahmen bezüglich der Interaktion von p53 und TRAIL-Rezeptoren vor allem, da beide Komponenten in ein kompliziertes molekulares Netzwerk integriert sind und es so viele Ansatzpunkte und eingreifende Faktoren zu berücksichtigen gibt.

Zusammenfassung

Der zur TNF-Superfamilie gehörende plasmamembranständige TRAIL-R2 kann nach seiner Aktivierung durch Bindung seines Liganden sowohl apoptotische als auch nicht-apoptotische Signale induzieren, die neben einem programmierten Zellsterben auch Inflammation, Invasion, Tumorprogression sowie Metastasierung auslösen können. Darüber hinaus fand die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Anna Trauzold eine neuartige Funktion des TRAIL-R2, der im Zellkern vorliegend mit den Proteinen des Mikroprozessorkomplexes interagiert und so über eine Regulation der miRNA-Prozessierung zur Tumorprogression beiträgt. Interessanterweise wird die Transkription des TRAIL-R2-Gens durch das Tumorsuppressorprotein p53 reguliert, welches als Transkriptionsfaktor je nach Schwere einer Zellschädigung reversiblen oder irreversiblen Zellzyklusarrest, DNA-Reparaturmechanismen und/oder Apoptose auslösen kann. Da neben dieser direkten Regulation zudem in eigenen Vorarbeiten herausgestellt wurde, dass TRAIL-R2 und p53 im Zellkern miteinander interagieren, war es Ziel dieser Arbeit ein genaueres Verständnis darüber zu erhalten, inwieweit sich der TRAIL-R2 auf die Aktivität und damit die anschließenden Funktionen von p53 als Tumorsuppressorprotein auswirkt.

Es konnte gezeigt werden, dass beide Proteine gleichzeitig im Zellkern vorliegen und in einem Großteil der Zellen direkt kolokalisieren. Weitere Untersuchungen ergaben, dass es unter einer TRAIL-R2-Hemmung zu einer Aktivitätssteigerung von p53 und nachfolgend auch zu einer erhöhten Expression seiner Zielgene kommt. Nicht nur die Apoptose-auslösenden Proteine waren hiervon betroffen, auch die für die Dedifferenzierung und Metastasierung wichtigen EMT-Faktoren wurden unter einer Herunterregulation des TRAIL-R2 vermehrt exprimiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Hochregulation von TRAIL-R2 und Interaktion mit p53 nicht, wie bisher vermutet, tumorunterdrückende Auswirkungen hat, sondern, dass der TRAIL-R2 p53 in seiner Funktion als Tumorsuppressorprotein dahingehend inhibiert, dass eine Gewährleistung der unversehrten Zellstabilität aufgrund geregelt ablaufender anti-tumoraler Signalwege nicht mehr gegeben ist. Tumorzellen können so einen Ausweg aus der p53-induzierten Zellüberwachung finden, wenn sie selber den TRAIL-R2 hochregulieren und von diesem wiederum in seinen Funktionen unterdrückt werden.

Literaturverzeichnis

1. Lane, D. P. & Crawford, L. V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**, 261–263 (1979).
2. Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15–16 (1992).
3. Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A. J. Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307–310 (2000).
4. Moll, U. M. & Petrenko, O. The MDM2-p53 interaction. *Mol. Cancer Res.* **1**, 1001–1008 (2003).
5. Barak, Y., Juven, T., Haffner, R. & Oren, M. mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* **12**, 461–468 (1993).
6. Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323–331 (1997).
7. Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y. & Prives, C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* **91**, 325–334 (1997).
8. Stott, F. J., Bates, S., James, M. C. & McConnell, B. B. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J.* **17**, 5001–5014 (1998).
9. Jin, S. & Levine, A. J. The p53 functional circuit. *J. Cell Sci.* **114**, 4139–4140 (2001).
10. Sionov, R. V & Haupt, Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* **18**, 6145–6157 (1999).
11. Karimian, A., Ahmadi, Y. & Yousefi, B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. **42**, 63–71 (2016).
12. Rufini, A., Tucci, P., Celardo, I. & Melino, G. Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene* **32**, 5129–43 (2013).
13. Pietsch, E. C., Sykes, S. M., McMahon, S. B. & Murphy, M. E. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* **27**, 6507–6521 (2008).
14. Nicholson, D. W. & Thornberry, N. A. Apoptosis - Life and death decisions. *Science* **299**, 214–5 (2003).
15. Liu, X., Yue, P., Khuri, F. R. & Sun, S. Y. p53 upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site. *Cancer Res.* **64**, 5078–5083 (2004).
16. Wu, G. S. *u. a.* KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death

- receptor gene. *Nat. Genet.* **17**, 141–143 (1997).
17. Malkin, D. Li-Fraumeni syndrome. *Genes Cancer* **84**, 735–740 (2011).
 18. Iwakuma, T., Lozano, G. & Flores, E. R. Li-Fraumeni syndrome: A p53 family affair. *Cell Cycle* **4**, 865–867 (2005).
 19. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Curtis, C. p53 Mutations in Human Cancers. 49–53 (1991).
 20. Freed-Pastor, W. A. & Prives, C. Mutant p53: One name, many proteins. *Genes Dev.* **26**, 1268–1286 (2012).
 21. Aas, T. *u. a.* Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat. Med.* **2**, 811–814 (1996).
 22. Gasco, M., Shami, S. & Crook, T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **4**, 70–76 (2002).
 23. Wattel, E. *u. a.* P53 Mutations Are Associated With Resistance To Chemotherapy and Short Survival in Hematologic Malignancies. *Blood* **84**, 3148–3157 (1994).
 24. El Rouby, S. *u. a.* p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression. *Blood* **82**, 3452–9 (1993).
 25. Dittmer, D. *u. a.* Gain of function mutations in p53. *Nat. Genet.* **4**, 42–46 (1993).
 26. Oren, M. & Rotter, V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, 1–15 (2010).
 27. Khromova, N. V., Kopnin, P. B., Stepanova, E. V., Agapova, L. S. & Kopnin, B. P. p53 hot-spot mutants increase tumor vascularization via ROS-mediated activation of the HIF1/VEGF-A pathway. *Cancer Lett.* **276**, 143–151 (2009).
 28. Pal, S., Datta, K. & Mukhopadhyay, D. Central role of p53 on regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in mammary carcinoma. *Cancer Res.* (2001).
 29. Qin, G. *u. a.* Cell cycle regulator E2F1 modulates angiogenesis via p53-dependent transcriptional control of VEGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2006). doi:10.1073/pnas.0509533103
 30. Ravi, R. *u. a.* Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* (2000). doi:10.1101/gad.14.1.34
 31. Masoud, G. N. & Li, W. HIF-1 α pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B* (2015). doi:10.1016/j.apsb.2015.05.007

32. Freedman, D. A., Wu, L. & Levine, A. J. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 96–107 (1999).
33. Wiley, S. R. *u. a.* Identification and Characterization of a New Member of the TNF Family that Induces Apoptosis. *Immunity* **3**, 673–682 (1995).
34. Pitti, R. M. *u. a.* Induction of Apoptosis by Apo-2 Ligand, a New Member of the Tumor Necrosis Factor Cytokine Family*. *J. Biol. Chem.* **271**, 12687–12690 (1996).
35. Baetu, T. M. & Hiscott, J. On the TRAIL to apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**, 199–207 (2002).
36. Falschlehner, C., Emmerich, C. H., Gerlach, B. & Walczak, H. TRAIL signalling: Decisions between life and death. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 1462–1475 (2007).
37. Leblanc, H. & Ashkenazi, A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ.* **10**, 66–75 (2003).
38. Degli-Esposti, M. A. *u. a.* Cloning and Characterization of TRAIL-R3, a Novel Member of the Emerging TRAIL Receptor Family. *J. Exp. Med.* **186**, 1165–1170 (1997).
39. Degli-Esposti, M. A. *u. a.* The Novel Receptor TRAIL-R4 Induces NF- κ B and Protects against TRAIL-Mediated Apoptosis, yet Retains an Incomplete Death Domain. *Immunity* **7**, 813–820 (1997).
40. Mérimo, D. *u. a.* Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7046–55 (2006).
41. Emery, J. G. *u. a.* Osteoprotegerin Is a Receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* **273**, 14363–14367 (1998).
42. Truneh, A. *u. a.* Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors: DR5 is the highest affinity receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 23319–23325 (2000).
43. Hymowitz, S. G. *u. a.* Triggering Cell Death: The Crystal Structure of Apo2L/TRAIL in a Complex with Death Receptor 5. *Mol. Cell* **4**, 563–571 (1999).
44. Pennarun, B. *u. a.* Playing the DISC: Turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer. *BBA - Rev. Cancer* **1805**, 123–140 (2009).
45. Kischkel, F. C. *u. a.* Apo2L/TRAIL-Dependent Recruitment of Endogenous FADD and Caspase-8 to Death Receptors 4 and 5. *Immunity* **12**, 611–620 (2000).
46. Barnhart, B. C., Alappat, E. C. & Peter, M. E. The CD95 Type I/Type II model. *Semin. Immunol.* **15**, 185–193 (2003).
47. Li, H., Zhu, H., Xu, C.-J. & Yuan, J. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the

- Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* **94**, 491–501 (1998).
48. Antignani, A. & Youle, R. J. How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 685–689 (2006).
49. Li, P. *u. a.* Cytochrome *c* and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* **91**, 479–489 (1997).
50. Azijli, K., Weyhenmeyer, B., Peters, G. J., de Jong, S. & Kruyt, F. A. E. Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. *Cell Death Differ.* **20**, 858–868 (2013).
51. Siegmund, D. *u. a.* Role of caspases in CD95L- and TRAIL-induced non-apoptotic signalling in pancreatic tumour cells. *Cell. Signal.* **19**, 1172–1184 (2007).
52. Ehrhardt, H. *u. a.* TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF- κ B. *Oncogene* **22**, 3842–3852 (2003).
53. Trauzold, A. *u. a.* Multiple and synergistic deregulations of apoptosis-controlling genes in pancreatic carcinoma cells. *Br. J. Cancer* **89**, 1714–1721 (2003).
54. Trauzold, A. *u. a.* CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene* **20**, 4258–4269 (2001).
55. Jeremias, I. *u. a.* Inhibition of Nuclear Factor κ B Activation Attenuates Apoptosis Resistance in Lymphoid Cells. *Blood* **91**, 4624–4631 (1998).
56. Trauzold, A. *u. a.* TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* **25**, 7434–9 (2006).
57. Jouan-Lanhouet, S. *u. a.* TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. *Cell Death Differ.* **19**, 2003–2014 (2012).
58. Wu, X.-N. *u. a.* Distinct roles of RIP1–RIP3 hetero- and RIP3–RIP3 homo-interaction in mediating necroptosis. *Cell Death Differ.* **21**, 1709–1720 (2014).
59. Wang, H. *u. a.* Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Causes Necrotic Membrane Disruption upon Phosphorylation by RIP3. *Mol. Cell* **54**, 133–146 (2014).
60. Vanlangenakker, N., Berghe, T. Vanden & Vandenabeele, P. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell Death Differ.* **19**, 75–86 (2011).
61. Cooper, W. A. *u. a.* Role and Prognostic Significance of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Death Receptor DR5 in Non-small-Cell Lung

- Cancer and Precursor Lesions. *Am. Cancer Soc.* **113**, 135–142 (2008).
62. Leithner, K. *u. a.* Nuclear and cytoplasmic death receptor 5 as prognostic factors in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy. *Lung Cancer* **65**, 98–104 (2009).
 63. Dong, H. P. *u. a.* Death receptor expression is associated with poor response to chemotherapy and shorter survival in metastatic ovarian carcinoma. *Cancer* **112**, 84–93 (2008).
 64. Haselmann, V. *u. a.* Nuclear death receptor trail-r2 inhibits maturation of let-7 and promotes proliferation of pancreatic and other tumor cells. *Gastroenterology* **146**, 278–290 (2014).
 65. Bertsch, U., Röder, C., Kalthoff, H. & Trauzold, A. Compartmentalization of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor functions: emerging role of nuclear TRAIL-R2. *Cell Death Dis.* **5**, e1390 (2014).
 66. Zeng, Y. Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene* **25**, 6156–6162 (2006).
 67. Bartel, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* **116**, 281–297 (2004).
 68. Kim, V. N. Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol. Cells* **19**, 1–15 (2005).
 69. Rajewsky, N. MicroRNA target predictions in animals. *Nat. Genet.* (2006). doi:10.1038/ng1798
 70. Alles, J. *u. a.* An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res.* (2019). doi:10.1093/nar/gkz097
 71. Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell* **120**, 15–20 (2005).
 72. Baek, D. *u. a.* The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **455**, 64–71 (2008).
 73. Volinia, S. *u. a.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2006). doi:10.1073/pnas.0510565103
 74. Calin, G. A. *u. a.* Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

- (2002). doi:10.1073/pnas.242606799
75. Hammond, S. M. MicroRNAs as tumor suppressors. *Nat. Genet.* **39**, 582–583 (2007).
 76. Rufino-Palomares, E. E., Reyes-Zurita, F. J., Lupiáñez, J. A. & Medina, P. P. MicroRNAs as Oncogenes and Tumor Suppressors. in *MicroRNAs in Medicine* 223–243 (2013). doi:10.1002/9781118300312.ch14
 77. Lee, Y. *u. a.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–419 (2003).
 78. Han, J. *u. a.* The Drosha–DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* **18**, 3016–3027 (2004).
 79. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. & Cullen, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* **17**, 3011–3016 (2003).
 80. Hutvagner, G. *u. a.* A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the let-7 Small Temporal RNA. *Science (80-.)*. **193**, 834–838 (2001).
 81. Hermeking, H. p53 Enters the MicroRNA World. *Cancer Cell* **12**, 414–418 (2007).
 82. Yang, J. & Weinberg, R. A. Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Cell Press* 818–829 (2008). doi:10.1016/j.devcel.2008.05.009
 83. Berx, G., Raspé, E., Christofori, G., Thiery, J. P. & Sleeman, J. P. Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. *Clin. Exp. Metastasis* **24**, 587–597 (2007).
 84. Spaderna, S. *u. a.* The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res.* **68**, 537–544 (2008).
 85. Cano, A. *u. a.* The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* (2000). doi:10.1038/35000025
 86. Jean Paul Thiery, Hervé Acloque, Ruby Y.J. Huang & M. Angela Nieto. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* **139**, 871–890 (2009).
 87. Angela Nieto, M., Yun-Ju Huang, R., Jackson, R. A. & Paul Thiery, J. EMT: 2016. *Cell* **166**, 21–45 (2016).
 88. Bonnomet, A. *u. a.* A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. *Oncogene* (2012). doi:10.1038/onc.2011.540

89. Zhang, Y., Xu, L., Li, A. & Han, X. The roles of ZEB1 in tumorigenic progression and epigenetic modifications. *Biomedicine and Pharmacotherapy* (2019). doi:10.1016/j.biopha.2018.11.112
90. Burk, U. *u. a.* A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep.* **9**, 582–589 (2008).
91. Hill, L., Browne, G. & Tulchinsky, E. ZEB/miR-200 feedback loop: At the crossroads of signal transduction in cancer. *International Journal of Cancer* **132**, 745–754 (2012).
92. Wellner, U. *u. a.* The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1487–1495 (2009).
93. Gregory, P. A. *u. a.* The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat. Cell Biol.* **10**, 593–601 (2008).
94. Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S. & Al., E. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Invest.* **104**, 155–162 (1999).
95. Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K. & et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* **5**, 157–163 (1999).
96. Koschny, R. *u. a.* The promise of TRAIL—potential and risks of a novel anticancer therapy. *J Mol Med* **85**, 923–935 (2007).
97. Ashkenazi, A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 420–430 (2002).
98. Holoch, P. A. & Griffith, T. S. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): A new path to anti-cancer therapies. *Eur. J. Pharmacol.* **625**, 63–72 (2009).
99. Lemke, J., von Karstedt, S., Zingg, J. & Walczak, H. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death Differ.* **21**, 1350–64 (2014).
100. Ishimura, N., Isomoto, H., Bronk, S. F. & Gores, G. J. Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells. *Am. J. Physiol.* **290**, G129–G136 (2006).
101. Ganten, T. M. *u. a.* Prognostic significance of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in patients with breast cancer. *J Mol Med* **87**, 995–1007 (2009).
102. Brattain, M. G., Fine, W. D., Khaled, F. M., Thompson, J. & Brattain, D. E. Heterogeneity of Malignant Cells from a Human Colonic Carcinoma. *Cancer Res.* (1981).

103. Taewan Kim *u. a.* p53 regulates epithelial–mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. *J. Exp. Med* **208**, 875–883
104. Addison, C., Jenkins, J. R. & Sturzbecher, H. W. The p53 nuclear localisation signal is structurally linked to a p34_cdc2 kinase motif. *Oncogene* **5**, 423–426 (1990).
105. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. & Oren, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296–299 (1997).
106. Hermeking, H. p53 Enters the MicroRNA World. *Cancer Cell* **12**, 414–418 (2007).
107. Macher-Goeppinger, S. *u. a.* Prognostic value of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors in renal cell cancer. *Clin. Cancer Res.* **15**, 650–9 (2009).
108. McCarthy, M. M. *u. a.* Evaluating the expression and prognostic value of TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**, 5188–94 (2005).
109. Chen, J.-J. *u. a.* Mislocalization of death receptors correlates with cellular resistance to their cognate ligands in human breast cancer cells. *Oncotarget* **3**, 833–42 (2012).
110. Mert, U. *u. a.* Trail induces nuclear translocation and chromatin localization of trail death receptors. *Cancers (Basel)*. (2019). doi:10.3390/cancers11081167
111. Willms, A. *u. a.* TRAIL-receptor 2—a novel negative regulator of p53. *Cell Death Dis.* (2021). doi:10.1038/s41419-021-04048-1
112. Guan, B., Yue, P., Clayman, G. L. & Sun, S. Y. Evidence that the death receptor DR4 is a DNA damage-inducible, p53-regulated gene. *J. Cell. Physiol.* **188**, 98–105 (2001).
113. Clancy, L. *u. a.* Preligand assembly domain-mediated ligand- independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proceeding Natl. Acad. Sci.* **12**, 18099–18104 (2005).
114. Sun, X. X., Dai, M. S. & Lu, H. 5-fluorouracil activation of p53 involves an MDM2-ribosomal protein interaction. *J. Biol. Chem.* **282**, 8052–8059 (2007).
115. Takimoto, R. & El-Deiry, W. Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene* **19**, 1735–1743 (2000).
116. Secchiero, P. *u. a.* Synergistic cytotoxic activity of recombinant TRAIL plus the non-genotoxic activator of the p53 pathway nutlin-3 in acute myeloid leukemia cells. *Curr. Drug Metab.* **8**, 395–403 (2007).
117. Tchelebi, L., Ashamalla, H. & Graves, P. R. p53-independent Effects of Mdm2. *Subcell. Biochem.* **85**, 133–59 (2014).

118. Levrero, M. *u. a.* Structure, function and regulation of p63 and p73. *Cell Death Differ.* **6**, 1146–1153 (1999).
119. Stiewe, T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 165–8 (2007).
120. De Laurenzi, V. & Melino, G. Evolution of functions within the p53/p63/p73 family. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **926**, 90–100 (2000).
121. Flores, E. R. *u. a.* Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: Evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell* **7**, 363–373 (2005).
122. Thorsten Stiewe. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 165–168 (2007).
123. Zeng, X. *u. a.* MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Mol Cell Biol* **19**, 3257–3266 (1999).
124. Zhu, J., Jiang, J., Zhou, W. & Chen, X. The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res.* **58**, 5061–5 (1998).
125. Levrero, M. *u. a.* The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J. Cell Sci.* **1670**, 1661–70 (2000).
126. Jost, C. A., Marin, M. C. & Kaelin, W. G. p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* **389**, 191–194 (1997).
127. Westfall, M. D., Mays, D. J., Sniezek, J. C. & Pietenpol, J. A. The Delta-Np63-Alpha Phosphoprotein Binds the p21 and 14-3-3-Omega Promoters In Vivo and Has Transcriptional Repressor Activity That Is Reduced by Hay-Wells Syndrome-Derived Mutations. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2264–76 (2003).
128. Flores, E. R., Tsai, K. Y. & Crowley, D. p63 and p73 are required for p53- dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* **416**, 560–565 (2002).
129. Chang, C.-J. *u. a.* p53 regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nat. Cell Biol.* **13**, 317–323 (2011).
130. Knouf, E. C. *u. a.* An integrative genomic approach identifies p73 and p63 as activators of miR-200 microRNA family transcription. *Nucleic Acids Res.* **40**, 499–510 (2012).
131. Boominathan, L. The Tumor Suppressors p53, p63, and p73 Are Regulators of MicroRNA Processing Complex. *PLoS One* **5**, 1–13 (2010).
132. Schmalhofer, O., Brabletz, S. & Brabletz, T. E-cadherin, β -catenin, and ZEB1 in

- malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* **28**, 151–166 (2009).
133. Lu, M. *u. a.* E-Cadherin Couples Death Receptors to the Cytoskeleton to Regulate Apoptosis. *Mol. Cell* **54**, 987–998 (2014).
134. Vogelstein, B. A deadly inheritance. *Nature* **348**, 681–682 (1990).
135. Nigro, J. M. *u. a.* Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* **342**, 705–707 (1989).
136. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. 53 Function and Dysfunction. *Cell* **70**, 523–526 (1992).
137. Lane, D. P., Cheek, C. F. & Lain, S. p53-based cancer therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, (2010).
138. Selivanova, G. & Wiman, K. G. Reactivation of mutant p53: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Oncogene* **26**, 2243–2254 (2007).
139. Lowe, S. W. *u. a.* P53 Status and the Efficacy of Cancer Therapy in Vivo. *Science (New York, N.Y.)* **266**, 807–810 (1994).
140. Sheikh, M. S. & Fornace, A. J. Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis. *Leukemia* **14**, 1509–1513 (2000).
141. Daniels, R. A. *u. a.* Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues. *Cell Res.* **15**, 430–438 (2005).
142. Sheikh, M. S. *u. a.* The antiapoptotic decoy receptor TRID/TRAIL-R3 is a p53-regulated DNA damage-inducible gene that is overexpressed in primary tumors of the gastrointestinal tract. *Oncogene* **18**, 4153–4159 (1999).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank an die Personen aussprechen, ohne deren Hilfe und Verständnis das Zustandekommen dieser Arbeit undenkbar gewesen wäre.

In erster Linie richtet sich mein Dank an meine Doktormutter, Prof. Dr. Anna Trauzold, die mir während der gesamten praktischen, theoretischen und schriftlichen Periode sowie bei der Anfertigung dieser Arbeit generell mit Ideen, konstruktiver Kritik sowie supportiv zur Seite stand. Vor allem der Einblick in einen fachfremden Bereich hat mich persönlich fachlich gefordert als auch vorangebracht.

Ein besonderer Dank geht an die Kollegen der AG Trauzold sowie dem gesamten Team des Instituts für Experimentelle Tumorforschung. Die Hilfsbereitschaft, anregenden Gespräche sowie die herzliche Umgebung haben mich sehr gerne in diesem Umfeld arbeiten lassen. Insbesondere Gökhan Alp möchte ich für die technische Unterstützung hervorheben. Zudem sind auch besonders den AGs um Prof. Dr. Susanne Sebens sowie Prof. Dr. Heiner Schäfer für die wissenschaftliche Begleitung meiner Promotion zu danken.

Weiterhin ein riesen Dankeschön an meinen engen Freundeskreis, der meinen Weg bisher begleitet hat. Namentlich möchte ich meine beste Freundin, Lisa, erwähnen. Danke für die vielen Jahre unserer Freundschaft und das untrennbare Band trotz Entfernung und Zeitmangel. Du weißt, wem ich diese Arbeit widme – ich bewundere deine Stärke.

Mein größter Dank gilt meiner Familie – insbesondere meinen Eltern und meinem Bruder, die seit ich denken kann, hinter mir stehen, Verständnis zeigen und klare Worte finden. Von ganzem Herzen vielen Dank für Eure unermüdliche Unterstützung, Euren Zuspruch, Euer Fördern aber auch für Eure Kritik. Ihr habt mir stets Türen geöffnet ohne mich einzuschränken und ich kann nicht glücklicher über Euren Halt sein.

Anhang – Eidesstaatliche Erklärung, Information

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Michelle Poelker (geboren am 20.02.1991 in Lübeck), an Eides statt, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Abhandlung nach den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Dabei habe ich keine Hilfe, außer der wissenschaftlichen Beratung durch meine Doktormutter Prof. Dr. Anna Trauzold und durch die namentlich erwähnten Kooperationspartner in Anspruch genommen. Diese Arbeit wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlichen Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben und zu erwerben gesucht. Diese Arbeit wurde bisher keinem Prüfungsverfahren vorgelegt. Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht in Willms et al., Cell Death and Disease (2021).

Hannover, 10.01.2022

Michelle Poelker

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom 01. März 2014 bis 31. Juni 2018 an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel am Institut für experimentelle Tumorforschung im Krebszentrum Nord, Sektion molekulare Onkologie, unter der Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Anna Trauzold angefertigt.