

Aus der Klinik für Innere Medizin mit
Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Identifikation der p53-Zielgene *phlda3* und *sestrin2* als Teil
eines mTOR-vermittelten Seneszenz-Signalwegs

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anne Gerhardt

aus Halle-Saale

Datum der Promotion: 25.06.2017

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	7
Abstract	9
1 Einleitung	11
1.1 Zelluläre Seneszenz	11
1.1.1 Das Hayflick-Limit	11
1.1.2 Stress-induzierte zelluläre Seneszenz	12
1.1.3 Biomarker der zellulären Seneszenz	14
1.1.4 Mechanismen zellulärer Seneszenz	17
1.2 Zelluläre Seneszenz als Anti-Tumor-Mechanismus	21
1.2.1 Zelluläre Seneszenz inhibiert die Tumorgenese in prämaligen Läsionen	21
1.2.2 Zelluläre Seneszenz als Antwort auf Tumorthherapie	22
1.3 Der Tumorsuppressor p53	23
1.3.1 p53 – Wächter des Genoms	23
1.3.2 Die Rolle von p53 in Seneszenz	25
1.3.3 p53-abhängige Expression von p53-Zielgenen.....	27
1.4 p53 und Myc in der Lymphomogenese	29
1.4.1 Defekte des p53-Gens in der Lymphomogenese.....	29
1.4.2 c-Myc Überexpression in Lymphomen.....	29
1.4.3 Myc-induzierte „failsafe“ Mechanismen.....	30
1.5 Der PI3K – AKT – mTOR – Signalweg	31
1.6 Ziel dieser Arbeit	33
2 Material und Methoden	35
2.1 Material	35
2.1.1 Geräte und Software	35
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	36
2.1.3 Allgemeine Substanzen, Lösungen und Puffer	36
2.1.4 Medien	42
2.1.5 Vektoren	43
2.1.6 Antikörper	44
2.1.5 Enzyme	45
2.1.6 TaqMan [®] -Sonden	46
2.2 Methoden	49
2.2.1 Mausmodelle	49

2.2.1.1 Das E μ -Myc-Maus-Modell.....	49
2.1.1.2 Die p53-Knockout-Maus.....	49
2.2.1.3 Das p53 ^{ERTam} -Maus-Modell.....	50
2.2.2 Zellbiologische Methoden.....	51
2.2.2.1 Lymphomzellgewinnung und –kultur.....	52
2.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	52
2.2.2.3 Wirkstoffbehandlung der Lymphomzellen.....	53
2.2.2.4 Phoenix-Zell-Kultur.....	55
2.2.2.5 Feeder-Zell-Kultur.....	55
2.2.2.6 Produktion ecotroper Viren durch Phoenix-Zellen.....	56
2.2.2.7 Phoenix-Zell Transfektion - Kalzium-Chlorid-Präzipitation.....	56
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	57
2.2.3.1 DNA-Extraktion.....	57
2.2.3.2 Genotypisierungs-PCR.....	57
2.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	58
2.2.3.4 RNA-Extraktion.....	59
2.2.3.5 cDNA-Synthese.....	60
2.2.3.6 Relative-quantitative-PCR (TaqMan [®] Assay).....	60
2.2.3.7 Klonierung der sh-Sonde gegen TSC2.....	62
2.2.3.9 Isolierung von DNA aus Gelen.....	63
2.2.3.10 Restriktionsverdau.....	63
2.2.3.11 Vektor-Insert-Ligation.....	64
2.2.3.12 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmiden.....	64
2.2.3.13 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Zellen.....	65
2.2.3.14 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	66
2.2.4 Seneszenz Assays.....	66
2.2.4.1 SA- β -Galactosidase Färbung.....	66
2.2.4.2 Zell-Zyklus-Analyse mit BrdU/PI Färbung.....	67
2.2.4.3 Wachstumsbeobachtung.....	68
2.2.5 Proteinbiochemische Methoden.....	68
2.2.5.1 Protein-Extraktion.....	68
2.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	68
2.2.5.3 SDS-PAGE.....	69
2.2.5.4 Immunoblots.....	70
2.2.5.5 Proteindetektion.....	70
2.2.5.6 Strippen der Membranen.....	71
2.2.6 Mausbehandlung.....	71
2.2.7 Statistische Auswertung.....	71
3 Ergebnisse.....	73

3.1 TIS und OIS in primären Lymphomzellen.	73
3.1.1 Induktion von TIS in myc;p53 ^{+/+} -, aber nicht in myc;p53null-Lymphomen	74
3.1.2 Induktion von Seneszenz nach Reaktivierung von p53 in myc;p53 ^{ERTam/-} -bcl2 transduzierten Lymphomen	75
3.1.3 Die Aktivierung von p53 in myc;p53 ^{ERTam/-} -bcl2 transduzierten Lymphomen führt zur Proteininduktion von p53-Zielgenen und Seneszenz-Markern.	77
3.2 p53-induzierte Zielgene in zellulärer Seneszenz	79
3.2.1 Differentiell regulierte Gene in TIS in bcl2-transduzierten myc- Lymphomzellen	79
3.2.2 Differentiell regulierte Gene in myc;p53null-bcl2-transduzierten Lymphomzellen	82
3.2.3 Differentiell regulierte Gene in myc;p53 ^{ERTam/-} -bcl2-transduzierten Lymphomzellen	84
3.2.4 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) in myc-transgenen TIS Lymphomzellen	88
3.3 p53-Zielgene inhibieren mTOR	90
3.3.1 Phlda3 und sestrin2 werden in seneszenten Lymphomzellen überexprimiert.....	90
3.3.2 Aktivierung von AMPK α und Deaktivierung des AKT-Signalweges in seneszenten Lymphomzellen.....	93
3.4 mTOR in TIS	94
3.4.1 Effektorfunktionen von mTORC1 in seneszenten Lymphomzellen	94
3.4.2 Die pharmakologische Beeinflussung von Ampk α und AKT induziert prämatüre Seneszenz in Kontroll-Lymphomen	96
3.4.3 TSC2-defiziente Zellen weisen einen Seneszenz-Defekt auf	99
3.5 Rapamycin-induziert prämatüre Seneszenz in vitro und in vivo	101
3.5.1 Rapamycin-induziert Seneszenz in p53-profizienten und -defizienten myc-Lymphomen .	101
3.5.3 Rapamycin hat Antitumor-Aktivität und induziert Seneszenz in Kontroll-Lymphomen in vivo	107
3.5.4 Rapamycin hat Antitumor-Aktivität in p53-defizienten Lymphomen in vivo.....	109
3.5.5 Pharmakologische Induktion von Seneszenz in Rapamycin-resistenten Lymphomzellen	112
4 Diskussion	115
4.1 Aktivierung von p53 in bcl2-protectierten myc;p53^{ERTam}-Lymphomen induziert prämatüre Seneszenz	116
4.2 Zellautonome und nicht zellautonome Funktionen von p53	117
4.3 p53-abhängige Expression von Inhibitoren des mTOR-Signalweges	121
4.4 Induktion von Seneszenz downstream von p53 – ein neues pharmakologisches Prinzip	123
4.5 Die Inhibition des mTOR-Signalweges führt zu einer effektiven Antitumor-Aktivität	127

4.6 Limitationen und Perspektiven.....	130
5 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	133
6 Abkürzungsverzeichnis.....	137
7 Literaturverzeichnis	139
8 Eidesstattliche Versicherung.....	153
9 Danksagung.....	155
10 Lebenslauf	156
11 Publikationen.....	156

Zusammenfassung

Einleitung: Zelluläre Seneszenz ist ein permanenter Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus und tritt auf in alternden Zellen sowie als Reaktion auf akute zelluläre Belastungen, wie z.B. DNA-schädigende Chemotherapie. Therapie-induzierte Seneszenz (TIS) wird durch den Tumorsuppressor p53 vermittelt. Die Aktivierung von p53 induziert die Expression einer Reihe von Zielgenen, einschließlich *sestrin2* und *phlda3*, die die mTOR-Aktivität modulieren: *Sestrin2* über die Aktivierung von AMPK α und *phlda3* über eine Hemmung von AKT. Anhand des E μ -myc-Maus-Lymphom-Modells wird gezeigt, dass die *sestrin2*- und *phlda3*-vermittelte Hemmung der mTOR-Funktion eine wichtige Komponente des p53-induzierten Seneszenz-Programms darstellt.

Methoden: p53-profiziente (Kontrolle) und p53-defiziente Lymphomzellen (LC) und LCs mit regulierbarem p53 (p53^{ERTam}, ein 4-OH-Tamoxifen (TAM)-induzierbares p53) wurden mit *bcl2* transduziert, um Apoptose zu blockieren. Anschließend wurden sie mit dem DNA-schädigenden Zytostatikum Adriamycin (ADR) bzw. TAM behandelt, um Seneszenz *in vitro* zu induzieren. Seneszenz wurde basierend auf der Seneszenz-assoziierten- β -Galactosidaseaktivität (SA- β -Gal) und BrdU/PI-Zellzyklus-Analysen nachgewiesen. Der AKT- und mTOR-Signalweg wurden durch Western Blot untersucht. Die Induktion von 39 bona fide p53-Zielgenen und 57 Seneszenz-assoziierten Genen wurde durch RTq-PCR analysiert. Pharmakologischen Wirkstoffe wie der AMPK α -Aktivator Metformin, der AKT-Inhibitor Triciribine, der mTOR-Inhibitor Rapamycin und der stabile Knockdown des Tuberosklerose-Gens (TSC2) wurden verwendet, um die Rolle des mTOR-Signalwegs in Seneszenz zu untersuchen. Außerdem wurde die Antitumoraktivität von Rapamycin *in vivo* getestet.

Ergebnisse: p53^{ERTam}-LCs mit aktiviertem p53 und ADR-exponierte Kontroll-LCs zeigten im Gegensatz zu ADR-behandelten p53-defizienten LCs eine Zunahme der SA- β -Gal-Aktivität und einen G1-Zellzyklusarrest. Im Vergleich der ADR- vs. TAM-seneszenten LCs konnten 12 gemeinsame p53-induzierbare Zielgene, einschließlich *sestrin2* und *phlda3* identifiziert werden. Die Aktivierung von p53 führte also über die Suppression von AKT und die Induktion von AMPK α zur Inaktivierung des mTOR-Signalwegs. Darüber hinaus haben wir gezeigt, dass nur die Kombination einer pharmakologischen Aktivierung von AMPK α und Hemmung von AKT zu einem seneszenten Phänotyp in

LCs führte. Dementsprechend hat ein Knockdown von TSC2 TIS zumindest teilweise blockiert. Schließlich führte die Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin zur Induktion von Seneszenz in p53-kompetenten und –defizienten Lymphomen. Dies suggeriert, dass die oben beschriebenen Signalwege tatsächlich Seneszenz downstream von p53 herbeiführen. Die *in vivo* Behandlung mit Rapamycin führte sowohl in Kontroll-Lymphomen, als auch in p53-defizienten Lymphomen zu einer verlängerten Überlebenszeit mit Induktion von Seneszenz in den Lymphknoten, nicht aber in mock-behandelten Kontrollen.

Fazit: Seneszenz wird charakterisiert durch die Aktivierung eines Netzwerkes von p53-abhängigen Zielgenen. Zwei Schlüsselkomponenten dieses Netzwerkes - sestrin2 und phlda3 – modulieren die mTOR-Aktivität über TSC2 und agieren damit als wesentliche Mediatoren des Seneszenz-Programms.

Abstract

Introduction: Cellular senescence is a permanent cell cycle arrest occurring as a G1 growth arrest in ageing cells or in response to acute cellular stresses, such as DNA-damaging chemotherapy. Therapy-induced senescence (TIS) depends on the activity of the tumor suppressor p53. Activation of p53 induces a set of target genes, including *sestrin2* and *phlda3*, which modulate mTOR activity: *Sestrin2* via activation of AMPK α , and *phlda3* via inhibition of AKT. By using the E μ -myc mouse lymphoma model, we show here that *sestrin2*- and *phlda3*-mediated inhibition of mTOR represent important components of the p53-governed senescence program.

Methods: p53 proficient (control) and p53 deficient lymphoma cells (LC) and those with regulatable p53 activity (p53^{ERTam}, a 4-OH-tamoxifen (TAM)-inducible p53 moiety) were transduced with *bcl2* to block apoptosis. Subsequently, they were treated with the DNA-damaging agent Adriamycin (ADR) or TAM to induce senescence *in vitro*. Senescence was detected based on senescence-associated- β -galactosidase activity (SA- β -Gal) and BrdU/PI cell cycle analyses. AKT and mTOR pathways were assessed by Western Blotting. The induction of 39 *bona fide* p53 target genes and 57 senescence associated genes was analyzed by RQ-PCR. Pharmacological agents, e.g. metformin – an activator of AMPK α , the AKT-inhibitor triciribine, the mTOR-inhibitor rapamycin, and stable knockdown of the Tuberous Sclerosis 2 (TSC2) gene product by sh-RNA were used to dissect the role of the mTOR pathway in senescence.

Results: p53 restored p53^{ERTam}-LC and ADR-exposed control LC, unlike equally ADR treated p53 deficient LC, showed increased SA- β -Gal activity and a G1 cell-cycle arrest. An overlapping set comprising of 12 p53 inducible target genes, including *sestrin2* and *phlda3*, was identified among ADR- vs. Tam-senescent LC. Concordantly, p53 activation repressed the AKT pathway and induced AMPK α , both contributing to the inactivation of mTOR. We furthermore showed that only combined pharmacological activation of AMPK α and inhibition of AKT induced a senescent phenotype in LC. Accordingly, knockdown of TSC2, at least in part, blocks TIS. Finally, treatment with the mTOR inhibitor rapamycin induced senescence in both p53-proficient and -deficient settings, thereby suggesting that the above described pathways indeed orchestrate senescence downstream of p53. Treatment of control lymphoma and p53 deficient lymphoma *in vivo* with rapamycin lead to a prolonged survival with senescence

detectable in lymph nodes of Rapamycin treated mice, but not their control counterparts.

Conclusion: Senescence is characterized by the activation of a p53 dependent target gene network. Two key components of this network – sestrin2 and phlda3 – modulate mTOR activity *via* TSC2 and thereby operate as essential mediators into senescence.

1 Einleitung

1.1 Zelluläre Seneszenz

Zelluläre Seneszenz ist ein terminaler Zellzyklusarrest, der durch verschiedene Stressfaktoren mit DNA-schädigender Wirkung ausgelöst werden kann. Dadurch verlieren seneszente Zellen die Fähigkeit, sich zu teilen, bleiben jedoch viabel und physiologisch aktiv. Seneszenz entsteht zum einen als replikative Seneszenz nach einer bestimmten Anzahl an Mitosen durch Telomerverkürzung mit irreparablen DNA-Schaden, sie kann aber auch prämaturn, d.h. akut, durch Onkogene oder Chemotherapie induziert werden.

1.1.1 Das Hayflick-Limit

In den 1960er Jahren beschrieben Hayflick und Moorhead erstmalig das Phänomen der zellulären Seneszenz. Sie verstanden Seneszenz als Zell-intrinsischen Mechanismus, welcher die unkontrollierte Proliferation gesunder Zellen verhindert. In ihren Experimenten beobachteten sie, dass in primärer Zellkultur von humanen, diploiden Fibroblasten nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen in der Zellkulturschale ein terminaler Wachstumsarrest eintritt (1). Sie unterteilten die Stadien der Zellkultur in 3 Phasen. In Phase I heften sich Zellen, welche einem Organismus entnommen wurden am Boden der Zellkulturschale an. Phase II beschreibt die Proliferationsphase. Wenn die Zellen den Boden einer Zellkulturschale komplett bedecken, gibt ihnen der Kontakt zu einer benachbarten Zelle ein Signal zum Wachstumsstopp. Werden diese Zellen auf neue Zellkulturschalen aufgeteilt, beginnen sie jedoch erneut, sich zu vermehren. Im Verlauf verlangsamen primär kultivierte Zellen ihr Wachstum (Wochen bis Monate), was dem Beginn der Phase III entspricht, bis die Zellen letztendlich ihre Zellteilung endgültig einstellen. Dabei erliegen sie nicht zwangsläufig dem Zelltod, sondern können auch bei voll erhaltener Viabilität stabil arretiert sein.

Hayflick und Moorhead bemerkten, dass primäre humane Fibroblasten in der Zellkultur nach ungefähr 50 Passagen aufhörten zu wachsen. Sie bezeichneten diesen Zustand als replikative Seneszenz. Dieses Phänomen wurde im Anschluss auch in zahlreichen anderen Zelltypen beobachtet, z.B. in Keratinozyten, Endothelzellen, Lymphozyten, etc. (2). Heute gilt, dass replikative Seneszenz in allen untransformierten, primären Zellen

nach einer gewebs- und speziesspezifischen Anzahl von Zellteilungen *in vitro* erreicht wird: in Mausembryo-Fibroblasten (MEFs) schon nach ca. 15 Passagen, obwohl ihr Medium eine ausreichende Konzentration an Wachstumsfaktoren enthält, in humanen Progenitorzellen der fetalen Leber nach 35 bis 45 Populationsverdopplungen (3). Der Wachstumsstopp in replikativ seneszenten Zellen wird durch die mit jeder DNA-Replikation fortschreitende Telomerverkürzung ausgelöst (4). Telomere sind die repetitiven DNA-Sequenzen samt assoziierten Proteinen, die sich am Ende jedes Chromosoms befinden. In den somatischen Zellen (Körperzellen) des Menschen ist das Enzym Telomerase, das normalerweise Telomere erneuert, nicht aktiv, weswegen ihre Telomere nach jeder Zellteilung kürzer werden. Menschliche Fibroblasten kann man unbegrenzt vermehren, d.h. immortalisieren, wenn man ihnen das Gen zuführt, das für die katalytische Untereinheit der Telomerase codiert (5). Die Verkürzung der Telomere ist aber nicht per se das Signal für einen Teilungsarrest. Das permanente und in Abwesenheit von Telomerase irreparable DNA-Schadensignal der kritisch erodierten Telomere setzt p53-abhängige oder p53-unabhängige DNA-Defekt-Kaskaden in Gang. Durch die Aktivierung dieser Kaskaden kommt es nach Induktion bestimmter Cyclin-Inhibitoren (unter anderem p21^{cip1} und p16) zu einem Zellzyklusarrest am G1 Checkpoint, der replikativen Seneszenz (6,7).

1.1.2 Stress-induzierte zelluläre Seneszenz

Dem zuvor beschriebenen Mechanismus wird eine Schutzfunktion zur Aufrechterhaltung der organismischen Integrität zugeschrieben. Dieser kann auch unabhängig von der Telomerlänge durch permanente Aktivierung der DNA-Schaden-Kaskade aktiviert werden und zelluläre Schutzmechanismen wie Apoptose, also den programmierten Zelltod, und Seneszenz auslösen. Replikative Seneszenz ist also ein spezifisches Beispiel für einen generellen Mechanismus, der durch viele verschiedene Formen von Stress ausgelöst wird. Ungefähr 40 Jahre, nachdem Hayflick und Moorhead die replikative Seneszenz beschrieben, wurde offensichtlich, dass bestimmte Stresssignale auch in proliferierenden Zellen einen permanenten und irreversiblen Zellzyklusarrest auslösen können, der phänotypisch von der replikativen Seneszenz nicht zu unterscheiden ist. Diese so genannte prämatüre Seneszenz wird u.a. durch oxidativen Stress, DNA-Schädigungen und die supraphysiologische Aktivierung von mitogenen Signalen ausgelöst. Normalerweise werden Zellen bei 20% Sauerstoff (O₂) kultiviert. Kultiviert man humane Fibroblasten aber bei 3% O₂, was eher den

physiologischen Gewebe-O₂-Konzentrationen entspricht, so kann man sie ca. 20 Mal häufiger passagieren (8). Im Gegenteil dazu verkürzen unphysiologische O₂-Konzentrationen >20% das Überleben der Zellen in Kultur (9). Nachdem man erkannte, dass die DNA-Schädigung durch stark verkürzte Telomere ursächlich ist für die Induktion replikativer Seneszenz, lag es nahe, dass auch andersartig ausgelöste Schäden der DNA zur Induktion von Seneszenz führen können. Zunächst fand man heraus, dass auch die Bestrahlung humaner Fibroblasten Seneszenz induziert (10). Aber auch weniger starke DNA-Schäden, wie der Verlust bestimmter DNA-Reperaturenzyme, die geschädigte Telomere reparieren, kann zu prämaturer Seneszenz führen. Ein weiterer Mechanismus der Induktion prämaturer Seneszenz ist die Behandlung mit DNA-toxischen Zytostatika. Man spricht dann von Therapie-induzierter-Seneszenz (TIS). Die Seneszenz-Antwort kann auch durch eine Hyperaktivierung von Onkogenen ausgelöst werden. Ein Onkogen ist die mutierte Form eines Proto-Onkogens. Das sind Gene, die in jeder Zelle vorkommen und für Proteine kodieren, die Wachstum, Teilung und Differenzierung einer Zelle kontrollieren und steuern. So kann zum Beispiel das Onkogen Ras einen permanenten, irreversiblen Wachstumsarrest auslösen (11). Diese Beobachtung ist die Grundlage der These, dass Seneszenz der Tumorentstehung entgegenwirkt (s.u.). Neben der Aktivierung bestimmter Gene spielen auch epigenetische Veränderungen eine entscheidende Rolle in zellulärer Seneszenz. Der Verlust von Bmi1 (ein Polycomb-Komplex-Protein) resultiert in prämaturer Seneszenz in murinen Fibroblasten (12). Des Weiteren ist die Aktivität der Histonmethyltransferase Suv39h1, und damit die Methylierung von Lysin9 an Histon3, mit der konsekutiven Ausbildung von Heterochromatin und Suppression pro-proliferativer Gene entscheidend für die Induktion und Aufrechterhaltung zellulärer Seneszenz (13). Retinoblastom-Protein gebundenes Suv39h1 führt durch lokales Heterochromatin-Remodeling zur stabilen Inaktivierung von E2F-Zielgenen und somit zu einem stabilen G1 Arrest.

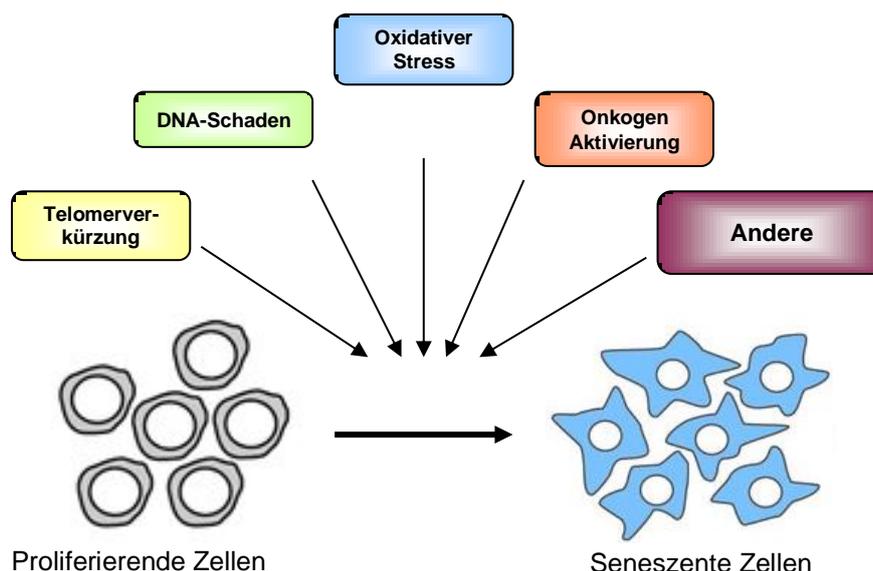


Abbildung 1.1 Mechanismen der Induktion zellulärer Seneszenz. Auslösende Faktoren stellen sowohl die Verkürzung von Telomeren, als auch eine Vielzahl stressinduzierender Stimuli wie oxidativer Stress, DNA-Schäden oder Aktivierung von Onkogenen dar (14).

1.1.3 Biomarker der zellulären Seneszenz

Senescente Zellen weisen eine Reihe charakteristischer Merkmale auf, die in der Zusammenschau den seneszenten Phänotyp ausmachen. Ein einziger verlässlicher Seneszenz-Marker ist bisher jedoch noch nicht etabliert worden. Ein entscheidender Biomarker der zellulären Seneszenz ist der Proliferationsstopp der Zellen. Dieser Austritt aus dem Zellzyklus findet am G1-S-Phase-Übergang statt (15). Der Stopp der DNA Synthese lässt sich durch die fehlende Inkorporation von 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) nachweisen. Die Irreversibilität des Wachstumsarrestes wird unter anderem durch das Ausbleiben der Zellteilung trotz Stimulation durch Wachstumsfaktoren im Kulturmedium deutlich. Senescente Zellen binden und metabolisieren Wachstumsfaktoren und weisen zwar Eigenschaften der späten G1 Phase auf, die DNA-Synthese wird jedoch nicht exekutiert (2). Ein weiterer auffälliger Marker ist die Morphologie der seneszenten Zelle: Die Zellen werden größer, verlieren ihre ursprüngliche Form und bilden einen abgeflachten Phänotyp aus. Außerdem imponieren senescente Zellen durch ihr flächiges, Vakuolen-reiches Zytoplasma (16), sowie ein erweitertes lysosomales Kompartiment. Der gebräuchlichste Biomarker ist daher der Aktivitätsnachweis der lysosomalen Seneszenz-assoziierten- β -Galactosidase (SA- β -Gal). Dieser erfolgt über eine β -Gal-katalysierte Umsetzung von X-Gal bei pH 6 (pH 5.5 bei Mäusen) und anschließender Oxidation des Produkts durch Luftsauerstoff,

wodurch tiefblauer Indigo-Farbstoff entsteht. Die meisten Zellen exprimieren eine lysosomale β -Galactosidase, die ihre optimale Aktivität bei einem pH-Wert von 4 aufweist. Präsenescente und seneszente Zellen färben sich gleichermaßen an, wenn die Färbung bei pH 4 durchgeführt wird. Nur bei einem pH-Wert von 6 (in humanen Zellen) konnte eine selektive Färbung von seneszenten Zellen nachgewiesen werden, so dass man in diesem Kontext von der sogenannten Seneszenz-assoziierten- β -Galactosidase spricht (17). Sowohl *in vitro*, als auch *in vivo*, korreliert der relative Anteil seneszenter Zellen mit der Passage-Zahl oder dem Alter des Organismus (17).

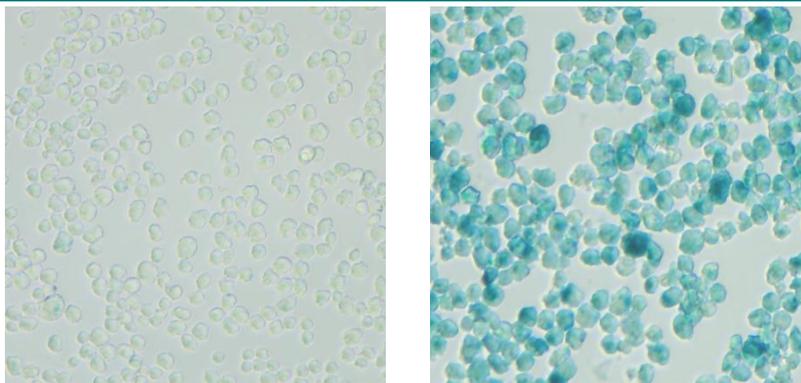


Abbildung 1.2 Proliferierende und seneszente murine Lymphomzellen nach SA- β -Gal Färbung

Weiterhin besitzen seneszente Zellen ein verändertes Genexpressionsprofil (18). Aufgrund des reduzierten replikativen Potentials alternder Zellen ist es nicht verwunderlich, dass auch Zellzyklusinhibitoren Seneszenz-Biomarker darstellen. Dabei kommt dem Protein p16Ink4a eine besondere Bedeutung zu. Eine Überexpression dieses Proteins in Geweben von Nagetieren ist direkt mit dem Alter des Organismus assoziiert (19). Gleichzeitig erfolgt in den meisten alternden Zellen eine verstärkte Expression von p21^{cip1} (20). Dies ist jedoch nicht zwingend notwendig. So konnte gezeigt werden, dass auch p21^{cip1}-defiziente Maus-Zellen in der Lage sind, einen seneszenten Phänotyp auszubilden (21). Gleiches gilt für p16Ink4a-defiziente MEFs (22). Die Aktivierung des Tumorsuppressors Rb (Retinoblastomprotein) durch p16Ink4a führt in einigen Zellen zur Formation der Seneszenz-assoziierten-Heterochromatin-Foci (SAHFs), die Chromatinstrukturen darstellen, an denen pro-proliferative Gene inaktiviert werden (13). In seneszenten Zellen konnte außerdem eine signifikante Expression und Sekretion exkretorischer Proteine gezeigt werden. Diese können grob in folgende Kategorien unterteilt werden: lösliche Faktoren, welche bestimmte Signalkaskaden

auslösen (Interleukine, Chemokine, Wachstumsfaktoren), sekretierte Proteasen und extrazelluläre-Matrix-Komponenten (23). Zur Beschreibung dieses Phänomens wurde der Begriff Seneszenz-assoziiertes-sekretorisches-Phänotyp (SASP) geprägt. Es wird angenommen, dass sowohl autokrine, als auch parakrine Effekte durch den SASP ausgelöst werden. Dadurch kommt es sowohl zur Verstärkung des seneszenten Phänotyps der seneszenten Zelle, als auch zur Induktion von Seneszenz in benachbarten Zellen. Dennoch existiert bis heute kein definierter Marker, der seneszenten Zellen eindeutig von proliferierenden Zellen unterscheidet. Obwohl die Liste der Biomarker der Seneszenz sich stetig vermehrt, bleibt bei den meisten dieser Marker unklar, welche kausale Rolle sie im Prozess der Seneszenz-Induktion und – Aufrechterhaltung spielen. Seneszenz-Marker müssen nicht notwendigerweise essentielle Seneszenz-Mediatoren sein.

Morphologische Veränderungen	Biochemische Veränderungen	Chromatin Veränderungen
<ul style="list-style-type: none"> • Zellvergrößerung • Verstärkte Granulierung • Zellgrenzen werden unschärfer • Vermehrung von Vakuolen im Zytoplasma 	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ SA-β-Galactosidase Aktivität, betont perinukläer • verminderte Aufnahme von BrdU (DNA-Synthese ↓) • vermehrte Proteinlevel von Seneszenz-Markern: <ul style="list-style-type: none"> - p16INK4a - p15INK4b - p21CIP1 - p53 - PML (promyelocytic leukemia gene product) - ARF - PAI (Plasminogen Aktivator Inhibitor) - Stromelysin/MMP3 - Marker des DNA-Schadens (γH2AX) 	<ul style="list-style-type: none"> • Seneszenz-assoziierte-Heterochromatinfoci (SAHF's) • Fokale Histon3 Lysin9 Trimethylierung • Fokale HP1 Rekrutierung

Abbildung 1.3 Biomarker der zellulären Seneszenz (modifiziert nach Schmitt C., Cellular senescence and cancer treatment). (24) Zelluläre Seneszenz geht einher mit typischen Veränderungen der Morphologie, biochemischen Veränderungen und einem Remodeling der Chromatinstruktur.

1.1.4 Mechanismen zellulärer Seneszenz

In den letzten Jahren wurden beachtliche Erfolge in der Aufklärung molekularer Mechanismen zellulärer Seneszenz verbucht. Jedoch ist noch nicht endgültig geklärt, ob diese Signaltransduktionswege Bestandteil von Seneszenz-Induktion sind oder Seneszenz-verursacht ablaufen. Die Aufklärung molekularer Seneszenz-Mechanismen ist kompliziert, da Seneszenz keinen einheitlichen zellulären Prozess darstellt. Vielmehr führt eine Vielzahl von Stimuli über verschiedenste Signalkaskaden zur Seneszenz-Induktion. Des Weiteren variieren diese Signaltransduktionswege sowohl zwischen Zell- als auch Speziesarten. Auf zellbiologischer Ebene sind in den Prozess der Zellalterung zahlreiche Tumorsuppressorgene und Onkogene eingeschlossen. Die aufgeführten intrazellulären Signaltransduktionskaskaden sind hier von besonderer Bedeutung (25).

1. *DNA damage/DDR/ATM/p53*

2. *p19ARF/p53/p21Cip1*

3. *p16INK4a/Rb/H3k9me3*

4. *PTEN/PI3K/AKT.*

In seneszenten humanen Fibroblasten ist zwar kein signifikanter Unterschied im Protein-Gehalt von p53 feststellbar, jedoch steigt die Phosphorylierung und somit die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor in Seneszenz (26). Je nach Ausmaß des DNA-Schadens induziert p53 zelluläre Schutzprogramme, welche zum vorübergehenden Wachstumsarrest, zu Seneszenz oder Apoptose führen. Die bei der replikativen Seneszenz erwähnten freien Telomereinzelnstränge sind ein Induktor des p53-Pfades. Außerdem führt der Verlust des p53-p21^{cip1} Signalweges zu einem Seneszenz-Defekt in humanen und murinen Zellen (27). Die Induktion von p53 wiederum führt zur Aktivierung von p21^{cip1}, welches die Aktivität von CDK2/CyclinE und CDK4/CyclinD blockiert. Die Inaktivierung der Cycline führt zur Hypophosphorylierung von Rb, welches wahrscheinlich den Zellzyklusarrest herbeiführt (28). Interessant ist nun, wie es zur Aktivierung von p53 kommt.

1. *DNA damage/DDR/ATM/p53* Die Serin-Proteinkinase Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) ist ein Enzym im Zellkern von tierischen Zellen, das als Sensor von DNA-Schäden, vor allem von DNA-Einzel- und -Doppelstrangbrüchen fungiert. DNA-Doppelstrangbrüche führen zur Rekrutierung von ATM an den Lokus des Schadens.

ATM bindet an die DNA, wird dort aktiviert und ist für die Phosphorylierung von mehreren „Downstream“-Elementen verantwortlich, zu denen die Checkpoint-Kinasen CHK1 und CHK2 und konsekutiv p53 gehören (29). So konnten Herbig et al. zeigen, dass die Verkürzung von Telomeren zur Aktivierung von ATM und schließlich zu Seneszenz via p53 und p21^{cip1}, aber nicht p16 führt (30).

2. p19ARF/p53/p21Cip1 p53 kann außerdem durch p14/ARF (p19/ARF in Mäusen) via MDM2 stabilisiert werden (31). ARF wird im alternativen Leseraster (alternate reading frame) neben p16^{INK4a} (einem Inhibitor der Rb-vermittelten G1-S-Phase-Progression) vom wichtigen Tumorsuppressor-Lokus *INK4a/ARF* kodiert (32). Der präzise Mechanismus der *INK4a/ARF*-Expressionsregulation ist unklar, doch konnte gezeigt werden, dass onkogenes Myc, Ras oder Bcr-Abl das ARF-Protein induzieren (33–35). Dieses wiederum inhibiert Mdm2 und damit dessen Funktion als p53-ubiquitinierende E3-Ligase (36). ARF stabilisiert daher indirekt p53 und verstärkt p53-abhängige zelluläre Schutzprogramme. Weiterhin ist die Expression von ARF in replikativ-seneszenten MEFs sowie in H-Ras abhängiger prämaturner Seneszenz induziert (37). ARF agiert somit als Tumorsuppressor in unterschiedlichen Systemen und viele Tumore zeigen bei Diagnose oder im Verlauf einen ARF Verlust (38).

3. p16INK4a/Rb Im Gegensatz zu p53 ist die Rolle des Retinoblastom-Proteins in zellulärer Seneszenz weniger klar. Studien aus den frühen 90ern, in denen Rb-hemmende Tumoviren überexprimiert wurden, zeigten eine Kooperation von Rb mit p53 in zellulärer Seneszenz (39). Des Weiteren zeigten Sage et al. mit einem Cre-Lox-System (ermöglicht das gezielte Entfernen von DNA-Sequenzen in lebenden Organismen), dass der Verlust aller drei Rb-Familienmitglieder in seneszenten Zellen zu einer Aufhebung des seneszenten Phänotyps führt (40). In humanen Fibroblasten kommt es durch den sequenziellen Verlust beider Rb-Allele zu einem Seneszenz-Verlust und einem Phänotyp ähnlich der mitotischen Krise (41). Diese Ergebnisse lassen auch eine entscheidende Rolle von Rb für die Aufrechterhaltung von Seneszenz vermuten. Rb bindet und inhibiert die Aktivität von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie und kontrolliert dadurch das Fortschreiten des Zellzyklus am Übergang der G1/S-Phase. Der Rb-Tumorsuppressor ist das Substrat der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) 2, 4 und 6 (42). Rb ist normalerweise an den Transkriptionsfaktor E2F gebunden, von dessen Zielgenen viele den Zellzyklus vorantreiben. Durch Bindung an E2F inhibiert Rb die Transaktivator-Eigenschaften von E2F. Durch

Hyperphosphorylierung wird pRb im Laufe der G1-Phase inaktiviert, was das Fortschreiten des Zellzyklus ermöglicht. Der zellzyklusinhibierende Effekt erfolgt über die Bindung von p16/INK4a an Cyclin D-abhängige Kinasen, wodurch die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (pRb) gehemmt wird. Es reprimiert die Transkription E2F-abhängiger Gene aktiv, indem es epigenetische Repressoren, wie zum Beispiel die Histon-Deacetylase HDAC1 oder die Histon-Methyltransferase Suv39h1 rekrutiert, welche H3k9 trimethyliert. In seneszenten Zellen vermittelt Rb somit die Bildung von fokalem Heterochromatin und das Gen-Silencing von E2F-abhängigen Genen (Narita et al., 2003). In vielen seneszenten Zellen kann eine starke p16 Expression nachgewiesen werden (Alcorta et al. 1996). Jedoch zeigen jüngere Studien, dass p16 nicht in allen seneszenten Zellen zwingend hochreguliert wird. Die Akkumulation von p16 steht jedoch im Zusammenhang mit der Formation von SAHFs und damit auch mit der Irreversibilität des Zellzyklusarrests. So ist es möglich, in seneszenten Zellen mit niedrigem p16 Gehalt, einen Wiedereintritt in den Zellzyklus durch Verlust von p53 zu bewirken und vice versa (43). Da auch die Induktion von p21^{cip1} zur Hypophosphorylierung von Rb führt, geht man davon aus, dass p16 und p21^{cip1} synergistisch wirken, wobei eventuell p21^{cip1} initial und kurzzeitig und p16 für die langfristige Hypophosphorylierung verantwortlich sind.

4. PTEN/PI3K/AKT. PTEN Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) katalysieren die Phosphorylierung von bestimmten Phospholipiden in der Zellmembran, sogenannten Phosphatidylinositolen. Diese, vor allem Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃), dienen als Andockstellen für Proteine, die als Ausgangspunkt von Signalkaskaden fungieren, v.a. die PH-Domänen enthaltende Proteinkinase B (auch Akt genannt) und PDK1. Der wichtigste Signalweg, den die PI3K so aktiviert ist der PI3K/Akt Signalweg. Ein Gegenspieler der PI3K ist die Phosphatase PTEN, die ein wichtiger Tumorsuppressor ist. PTEN ist eine Phosphatase, die Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) zu Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) konvertiert und damit antagonistisch zu den Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3-Kinasen) wirkt (44). Das Verhältnis von PTEN und PI3K kontrolliert die Menge an PIP₃. Der Verlust von PTEN begünstigt die Entstehung von Tumoren genauso wie die Überexpression der PI3K. Interessanterweise führt die Behandlung von humanen Fibroblasten mit PI3K-Inhibitoren zu einer reduzierten Lebensdauer von Zellen und beschleunigt das Einsetzen von Seneszenz (45). Auch die ektopische Expression von PTEN kann

Seneszenz induzieren, so zeigen Courtois-Cox-S et al., dass die Überexpression von PTEN sowie die Inhibition von PI3K Seneszenz induziert (46). Pandolfi und Kollegen (47) konnten jedoch als erste zeigen, dass auch der Verlust des Tumorsuppressor PTEN Seneszenz induzieren kann. Sie fanden heraus, dass die konditionale Inaktivierung von PTEN in murinen Prostatazellen zur Bildung von hochgradigen prostatichen intraepithelialen Neoplasien (PIN) führt, die seneszente Eigenschaften aufweisen. In Verbindung mit p53-Verlust, entwickeln sich diese Läsionen zu Prostatakarzinomen. Diese Form der Seneszenz wurde PTEN induzierte Seneszenz (PICS) genannt. Alimonti und Kollegen führten die Untersuchungen zu PICS fort und erarbeiteten ein Model der PTEN-loss getriggerten AKT-Aktivierung, die via mTOR-Aktivierung Seneszenz induziert. Ebenso zeigten sie einen Seneszenz-Verlust der PTEN-defizienten Zellen nach Behandlung mit Rapamycin (48). Diese Aussage steht im diametralen Widerspruch zu den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen.

An den genannten Beispielen wird deutlich, wie komplex die Regulation von Seneszenz abläuft. Die Beobachtungen legen nahe, dass übergeordnete Signalwege eine dezidierte Feinabstimmung erfordern, um die Zellproliferation im Gleichgewicht zu halten: Zu wenig oder zu viel Aktivität kann zytostatisch wirken.

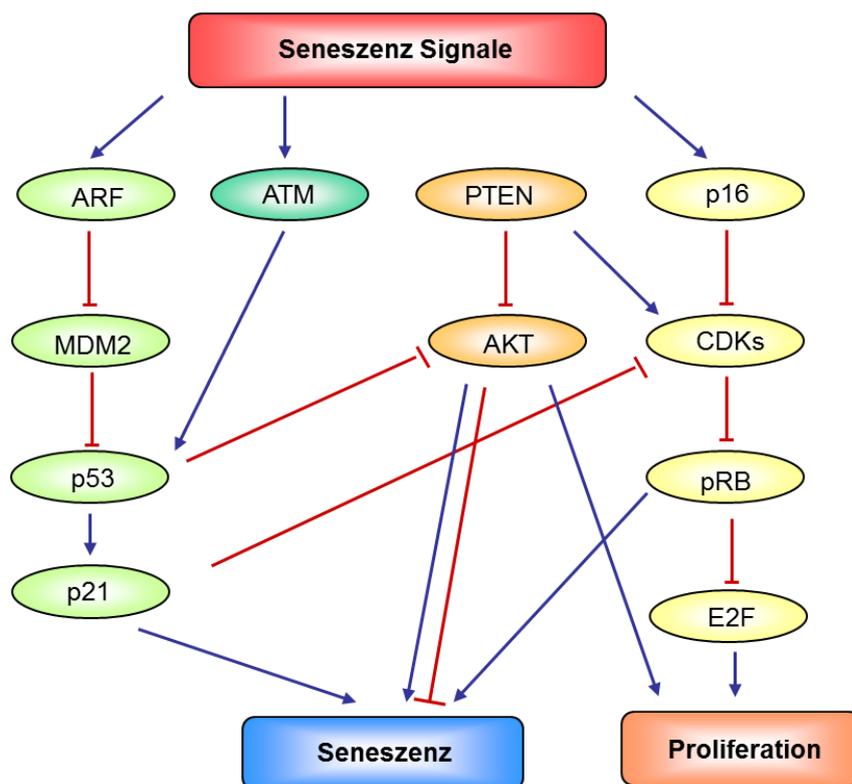


Abbildung 1.4 Verschiedenste Signale führen zur Aktivierung Seneszenz-induzierender Signalkaskaden. Nähere Erläuterungen siehe Text.

1.2 Zelluläre Seneszenz als Anti-Tumor-Mechanismus

Da Seneszenz durch zahlreiche Tumorsuppressoren reguliert wird, liegt es nahe, dass sie als Tumorsuppressormechanismus fungiert. In den letzten Jahren ist diese Hypothese durch eine Vielzahl von *in vitro* Versuchen und genetischen Mausmodellen eindrücklich untermauert worden (49,50).

1.2.1 Zelluläre Seneszenz inhibiert die Tumorgenese in prämaligen Läsionen

Das BRAF-Gen („proto-oncogene B-Raf“ oder „v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1“) kodiert für die Serine/Threonin-Protein-Kinase B-Raf, welche bei der Regulation des MAPK/ERK-Signalwegs eine Rolle spielt und u.a. Zellteilung und Zelldifferenzierung beeinflusst (51). Ein BRAF-induzierter Wachstumsarrest in melanozytären Nävi verlangsamt bzw. blockiert die Genese von Melanomen *in vivo*. Mutationen an der Aminosäureposition V600 des BRAF-Proteins werden bei etwa 50 Prozent der Melanome beobachtet. Auch in der Vorstufe, den Pigmentnävi, lässt sich häufig eine aktivierende Mutation im BRAF Gen finden. Dennoch sind die Melanozyten dieser Nävi oft jahrelang Wachstums-arretiert und entwickeln sich nur manchmal zu Melanomen. Michaloglou und Kollegen konnten zeigen, dass eine BRAF(V600E) Expression in humanen Melanozyten einen SA-β-Gal und p16/INK4a positiven Wachstumsarrest auslöst und detektierten SA-β-Gal Positivität und Ki-67 (Proliferationsmarker) Negativität in Proben von melanozytären Nävi *in situ* (52).

Auch die Karzinogenese Ras-getriebener Lungentumoren wird durch Seneszenz aufgehalten. Mit einem durch Cre-Rekombinase konditionell aktivierbaren K-Ras^{G12V}-Maus-Modell gelang es Serrano und Kollegen, nach Aktivierung des onkogenen Ras Lungentumoren zu erzeugen, die meisten davon Lungenadenome, einige Adenokarzinome. Diese Adenome zeigten aber interessanterweise nur eine geringe Ki67-Aktivität und eine ausgeprägte SA-β-Gal-Positivität, wohingegen die Adenokarzinome negativ für Seneszenz-Marker waren (53).

Für Prostatakarzinome konnte gezeigt werden, dass der Verlust von p53 ein kritischer Schritt für die Karzinogenese ist. Oft ist in frühen Läsionen ein Verlust von PTEN zu detektieren, in späten Läsionen kommen p53-Mutationen hinzu. Pandolfi und Kollegen deuten dies als ein Indiz für die Zusammenarbeit der beiden Tumorsuppressoren bei der Entstehung des Prostatakarzinoms und untersuchten dies mit einem konditionellen PTEN-defizienten Mausmodell. In der Tat führte die akute Inaktivierung beider PTEN-

Allele zu einem p53-abhängigen seneszenten Phänotyp in MEFs und Prostatakarzinome entstanden erst nach einer langen Latenz. Wurden aber PTEN und p53 inaktiviert, so entstanden hochaggressive Prostatakarzinome. In Proben niedriggradiger Prostatakarzinome ließen sich diesen Ergebnissen entsprechend SA- β -Gal-positive Areale detektieren (47).

In einem E μ -N-Ras^{G12D} transgenen Mausmodell, in dem typischerweise spät histiozytäre Tumoren entstehen, entwickelten sich in einem Suv39h1 defizienten Setting nach kurzer Zeit T-Zelllymphome (50). Im Gegensatz dazu wird in primären Lymphozyten nach Aktivierung von onkogenem Ras in Abhängigkeit von Suv39h1 und H3K9me3 ein seneszenten Wachstumsarrest induziert.

1.2.2 Zelluläre Seneszenz als Antwort auf Tumorthherapie

Zu den DNA-schädigenden Induktoren zellulärer Seneszenz gehören Gammastrahlung und Chemotherapeutika, also Agenzien, die bei der Behandlung von Tumoren verwendet werden. Bei diesen starken DNA-Schädigungen kann auch in transformierten Tumorzellen Seneszenz ausgelöst werden, die sogenannte Therapie induzierte Seneszenz (TIS). Im Allgemeinen ist das Ziel von Bestrahlung und Chemotherapie, die Tumorzellpopulation zu töten. Allerdings können einige Zellen im Tumor aufgrund von Mutationen, die die Apoptose-Kaskade betreffen, dem programmierten Zelltod entkommen (54). Bei Apoptose-selektiven Defekten kann aber potentiell noch immer Seneszenz ausgelöst werden (55). Im E μ -myc-Mausmodell beispielsweise reagieren Lymphome mit einem Apoptoseblock durch Bcl2-Überexpression mit einem seneszenten Arrest auf Chemotherapie und erwerben ggf. zusätzliche Mutationen im p53- oder INK4a-Locus, bevor sie sich zu therapieresistenten Lymphomen weiterentwickeln (55). Außerdem überlebten Mäuse mit Seneszenz-kompetenten Tumoren deutlich länger als solche mit Seneszenz-defekten Tumoren. Apoptose und Seneszenz ergänzen sich also als Anti-Tumor-Mechanismus.

Auch wenn bei TIS die Verkürzung der Telomere nicht ausschlaggebend ist (56), teilen replikative Seneszenz und Therapie-induzierte Seneszenz einige gemeinsame Merkmale wie den Wachstumsarrest, die abgeflachte Zellmorphologie, die Expression Seneszenz-typischer Marker und die Anfärbarkeit der Seneszenz-assoziierten- β -Galactosidase (17). Roninson und Kollegen konnten zeigen, dass verschiedene Zytostatika in mehreren Tumorzelllinien Seneszenz induzieren konnten. Zu diesen gehören unter anderem der DNA Polymerase Inhibitor Aphidicolin, der Topoisomerase-

II-Inhibitor Adriamycin, Etoposid und das zu DNA-Strang-Querverknüpfungen führende Cisplatin, aber auch der Antimetabolit Cytarabin (57). Auch für 5-FU konnte gezeigt werden, dass es in Fibroblasten zu einem seneszenten Phänotyp mit erhöhten Konzentrationen von β -Galactosidase führt (58).

Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Therapie-induzierte Seneszenz einen neuen Angriffspunkt in der Krebstherapie darstellt.

1.3 Der Tumorsuppressor p53

1.3.1 p53 – Wächter des Genoms

Das Produkt des Tumorsuppressorgens p53 wurde erstmals 1979 beschrieben und wenige Jahre später wurde auch das entsprechende Gen entdeckt. Das p53 Gen liegt auf dem kurzen Arm des menschlichen Chromosoms 17 und besteht aus 11 Exons. Sein Molekulargewicht beträgt 53 kDa und ist damit namensgebend.

Das p53-Protein ist ein Tumorsuppressor und stellt eine der wichtigsten Kontrollinstanzen für das Zellwachstum und somit auch einen Schwerpunkt der onkologischen Forschung dar. Der Tumorsuppressor p53 ist entscheidend an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt und hilft die genetische Stabilität der Zelle aufrecht zu erhalten (59). Die Bedeutung des Tumorsuppressor-Proteins p53 für die genomische Integrität der Zelle („Wächter des Genoms“ (59)) spiegelt sich in der Häufigkeit seiner Inaktivierung in humanen Tumoren wider. In mehr als 50% der humanen Tumore ist p53 von einer Mutation betroffen, und viele Tumore mit intaktem p53 Gen weisen Veränderungen in Genen auf, deren Produkte mit p53 interagieren oder sich in Signalwegen mit p53 befinden (60). Das p53-Protein spielt als Transkriptionsfaktor eine zentrale Rolle bei der Expression von Genen, die an der Regulierung der Apoptose und der DNA-Reparatur beteiligt sind. Unter normalen Bedingungen hat das p53 Protein eine Halbwertszeit von ca. 20 Minuten (61) und liegt in sehr geringen Mengen im Zellkern vor. Die geringe Halbwertszeit von p53 resultiert aus einer Rückkopplung, in der p53 seinen negativen Regulator Mdm2 direkt transkriptionell aktiviert (62). Durch die Bindung von Mdm2 an den N-Terminus von p53 wird die Bindungsstelle von transkriptionellen Ko-Aktivatoren maskiert und gleichzeitig die Ubiquitinierung und damit proteasomale Degradierung von p53 katalysiert (63). Die intrazelluläre Konzentration steigt bei Schäden der DNA stark an. Die Aktivierung des p53-Proteins erfolgt via

Phosphorylierung durch verschiedene Enzyme. Dazu gehören die ATM-Kinase (ataxia telangiectasia mutated kinase) und ATR (ATM und RAD3 related), CHK1 und 2, welche bei DNA-schädigenden Reizen (z.B. UV-Strahlung oder chemische Noxen) induziert werden (64). Durch die Phosphorylierung verändert das p53-Protein seinen Konformationszustand, so dass das Mdm2 seine Bindung löst und p53 in aktivierter Form vorliegt (65). Das Tumorsuppressor-Protein ARF, welches durch onkogene Stimuli wie Ras oder Myc aktiviert wird, bindet direkt an Mdm2. Durch diese Interaktion wird die Ubiquitin-Ligase Aktivität von Mdm2 inhibiert und Mdm2 aus dem Nukleoplasma in die Nukleoli verlagert, so dass ein Abbau von p53 durch Mdm2 nicht mehr möglich ist (66). Neben der Halbwertszeit wird p53 außerdem transkriptionell und translational kontrolliert, durch Veränderung seiner intrazellulären Lokalisation, Redoxstatus der Zelle, Bindeproteine und posttranslationale Modifizierung (67). Als Transkriptionsfaktor induziert das p53-Protein u.a. Gene, welche zu transientem Zellzyklusarrest, Seneszenz und Apoptose führen können. Es besitzt damit die Fähigkeit, den Zellzyklus zu unterbrechen und damit die Proliferation einer genomisch suspekten oder entarteten Zelle zu verhindern. Der Zellzyklusarrest gibt der Zelle Zeit, die DNA-Schäden zu reparieren oder bei nicht korrigierbaren Fehlern des Genoms den programmierten Zelltod oder Seneszenz einzuleiten. Der Zellzyklusarrest kann sowohl am G1-, als auch am G2-Restriktionspunkt erfolgen. Die Relevanz von p53 als Tumorsuppressor wird deutlich durch die Beobachtung, dass p53-defiziente Mäuse innerhalb kürzester Zeit Tumoren entwickeln (68). Analog dazu kommt es bei Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom auf dem Boden einer Keimbahnmutation von p53 zur frühzeitigen Entstehung von verschiedenen Tumoren mit einer Inzidenz von über 30% im Alter von 20 Jahren (69). In den letzten Jahren wurde evident, dass p53 nicht nur den Zellzyklus und Apoptose kontrolliert, sondern auch an Prozessen der Entwicklung und des Alterns beteiligt ist (70).

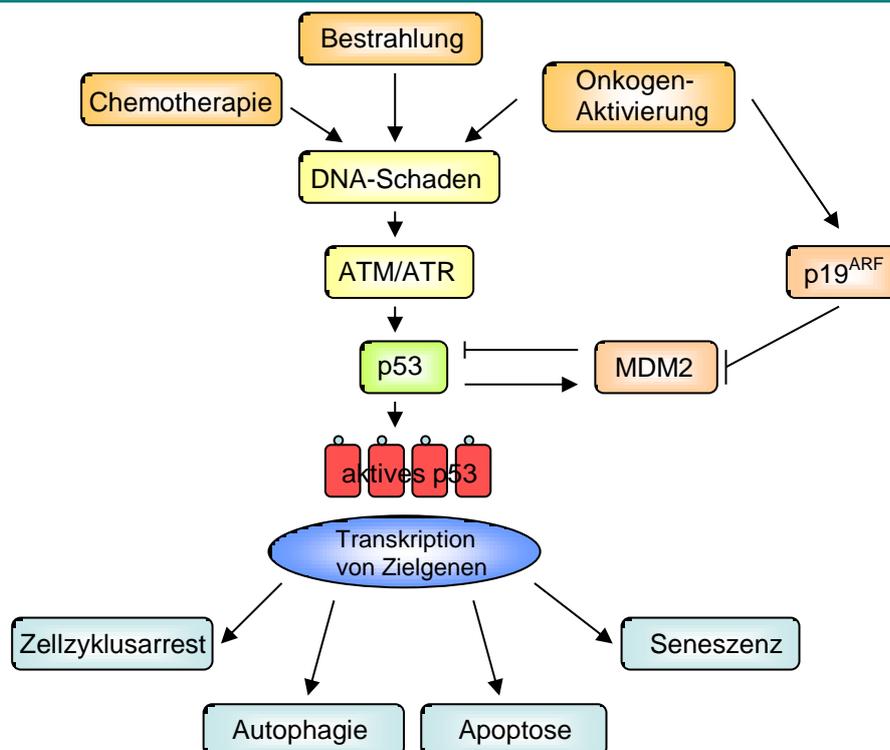


Abbildung 1.5 Das p53-Netzwerk: Der Tumorsuppressor p53 wird durch DNA-Schäden verschiedenster Art und durch Onkogene aktiviert. p53 wird daraufhin durch bestimmte Signalmediatoren phosphoryliert oder sein Abbau durch Inhibition von Mdm2 verhindert. Beide Vorgänge verlängern die Halbwertszeit von p53, indem sie seine Ubiquitylierung und konsekutiven proteosomalen Abbau verhindern. Damit verlängert sich die Halbwertszeit von Minuten auf Stunden. Aktives p53 oligomerisiert zu Tetrameren. In dieser Form wirkt es als Transkriptionsfaktor an p53-responsiven Elementen und führt zur Expression seiner Zielgene, die u.a. in DNA-Reparatur, Apoptose, Seneszenz oder Zellzyklusarrest involviert sind. Darüber hinaus hat p53 noch viele weitere Effektorfunktionen, wie die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität, Einfluss auf den Zellmetabolismus und das endosomale Kompartiment.

1.3.2 Die Rolle von p53 in Seneszenz

Wie bereits erwähnt, kann zelluläre Seneszenz über den p53-p21 und p16-Rb-Pfad vermittelt werden. Diese beiden Signalwege werden durch verschiedene Stimuli aktiviert und sind in ihrer Antwort abhängig vom Zelltyp. Zwischen beiden Signalwegen gibt es beträchtliche Schnittstellen. So aktivieren verschiedene Signale ARF, welches wiederum MDM2 inhibiert und somit p53 stabilisiert. p53 induziert p21^{cip1}, welches über Inhibition von Cyclin-abhängigen-Kinasen zum Zellzyklusarrest führt (71). p21^{cip1} inhibiert CDKs „upstream“ des Tumorsuppressors Rb, wodurch Rb in seiner hypophosphorylierten Form vorliegt und E2F hemmt. Die Deregulation von E2F kann wiederum ARF aktivieren und zur Stabilisierung von aktivem p53 führen (72). Diese Redundanz unterstreicht die Relevanz von Seneszenz als Tumorsuppressormecha-

nismus und hebt die Komplexität des Wechselspiels der verschiedenen Stimuli in verschiedenen Kontexten hervor.

Bis heute ist es nicht geklärt, wie p53 oder p16-Rb Seneszenz induzieren und aufrechterhalten. Beide können auch einen transienten Arrest auslösen, so dass sich die Frage ergibt, welche Signale für einen transienten oder einen permanenten, seneszenten Zellzyklus-Arrest verantwortlich sind. Dies hängt eventuell davon ab, ob das Seneszenz-Signal aufrechterhalten wird oder sekundäre Events die Zelle im Arrestzustand halten. Hier seien beispielsweise die oben erwähnten SAHFs und Heterochromatinremodeling genannt (73).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass einige der von p53 ausgeführten Funktionen nicht zell-autonom stattfinden, wobei besonders die Vielzahl von sekretorischen Faktoren zu nennen ist, die p53-abhängig induziert werden (23,73,74). Dazu gehören ECM-degradierende Proteine, Interleukine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und ECM-Faktoren (siehe 1.1.3). p53 ist für diesen SASP sowohl direkt als Transkriptionsfaktor einiger dieser Faktoren als auch indirekt als Induktor für weitere Signalkaskaden entscheidend. Der Einfluss von p53 auf den SASP scheint essentiell für seine Rolle als Tumorsuppressor zu sein. So zeigten Xue und Kollegen, dass die Reaktivierung von endogenem p53 in einem Leberkarzinommodell zur Regression der Tumoren führte. Bemerkenswerterweise war der Haupteffekt die Induktion von Seneszenz, die mit der Sekretion von SASP Faktoren einherging und zur konsekutiven Attraktion von Immunzellen und Elimination der Tumorzellen führte (75).

Lowe und Kollegen identifizierten zudem den nuclear factor- κ B (NF- κ B) als entscheidenden Regulator des SASP, welcher mehr Gene reguliert als Rb und p53 gemeinsam. In seneszenten Fibroblasten zeigten sie, dass p53 und NF- κ B dabei kooperieren und erst der kombinierte knock down beider Gene einen Seneszenz-Bypass ermöglicht. In murinen Lymphomen konnte außerdem Seneszenz-Induktion durch Inhibition von NF- κ B verhindert werden (76). Diese Daten unterstützen die Relevanz von p53 induzierter Seneszenz als akute Antwort in der Tumorthherapie, erlauben aber auch Spekulationen über den Zusammenhang von Verlust/Mutationen von p53 und Immune-Escape Mechanismen während der Tumorgenese. Neben seiner Funktion als Tumorsuppressor wurde p53-abhängige Seneszenz auch als entscheidender Mechanismus bei einer Reihe weiterer Pathologien beschrieben. Dazu gehört die Verhinderung der Leberfibrose und die Entstehung von Arthrose (77,78).

1.3.3 p53-abhängige Expression von p53-Zielgenen

Als Antwort auf zahlreiche zelluläre Stresssignale wird p53 sowohl durch Proteinstabilisation, als auch durch posttranslationale Modifikationen aktiviert (79). p53 Tetramere binden sequenzspezifisch an p53 Response Elements. Über die zentrale DNA-Bindungsdomäne bindet p53 an DNA der palindromischen und degenerierten Konsensus-Sequenz 5'-RRRCWWGYYY-3'(R=A/G, W=A/T, Y=C/T) (70). Untersuchungen mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) mit Sequenzierung der präzipitierten DNA Abschnitte (ChIP-Seq) zeigten, dass p53 an rund 500 Response-Elemente im humanen Genom bindet, während Hochrechnungen von Analysen mittels ChIP gekoppelt an Microarray (ChIP-on-chip) auf bis zu 4000 Response-Elemente kamen (80,81). Diese Konsensus-Sequenzen werden typischerweise in den Promotoren oder im ersten Intron der p53-Zielgene gefunden. Wenn p53 an die DNA gebunden hat, führt es zur Transkription zahlreicher proteinkodierender und nicht-proteinkodierender Gene (z.B. microRNAs), aber auch zur Repression von Genen. Auch die Chromatin-Konfiguration ist ein weiterer Modifikator der p53-Zielgen-Aktivierung (82,83). Durch diese Mechanismen kann p53 seine unterschiedlichen Funktionen ausüben (84).

Welcher seiner möglichen Effektorfunktionen p53 in einer Zelle auslöst, hängt ab vom Zelltyp, der Art des Stressors und vom Milieu in dem sich die Zelle befindet. Falls der zelluläre Schaden nicht zu stark ausgeprägt ist, kommt es zu einem transienten Zellzyklusarrest und Reparatur der DNA. Ist der Schaden stärker, so wird das Apoptose- oder Seneszenz-Programm angeschaltet. *Bax*, *Noxa*, *Fas* und *Puma* beispielsweise sind p53-Zielgene, die für die Apoptose essentiell sind (85). In anderen Konstellationen wird jedoch Seneszenz ausgelöst, die mit der Transkription von u.a. p21, PAI und PIG3 einhergeht (86).

Neben seinen zahlreichen antiproliferativen Wirkungen hat p53 auch entscheidenden Einfluss auf den Metabolismus einer Zelle. Vousden und Kollegen berichten auch über einen „Anti-Warburg“ Effekt, welcher einen fundamentalen Bestandteil der malignen Transformation antagonisiert (87). Der Warburg-Effekt beschreibt, dass Tumorzellen ihre Energie im Wesentlichen durch nicht-oxidativen Glukosestoffwechsel, d.h. durch Fermentation aufrechterhalten. Über die Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK α) hat p53 einen inhibierenden Einfluss auf das mammalian target of rapamycin (mTOR), ein zentraler Regulator der Proteinsynthese. Auf diese Art und Weise reguliert

p53 auch metabolisch das Zellwachstum (88). Eine weitere mögliche Antwort des Tumorsuppressors p53 auf metabolischen Stress ist die Regulation von Autophagie. Die Autophagie ist ein evolutionär hochkonservierter lysosomaler Degradationsprozess zum Abbau alterierter zellulärer Bestandteile (wie fehlerhafter Proteine und geschädigter Organellen) oder zum Substrat-Recycling durch Degradation von Makromolekülen. p53 induziert Autophagie u.a. durch Expression von DRAM (damage-regulated autophagy modulator) (89) und durch Inhibition von mTOR.

Wie bereits erwähnt erstreckt sich die Wirkung von p53 über die Zellgrenze hinweg. Durch Expression von Genen wie Thrombospondin1 (TSP1) und Kollagen-prolyl-4-hydroxylase [α (II)PH] wird die Angiogenese inhibiert und leukemia inhibitory factor (LIF) spielt eine Rolle bei der Implantation von Embryonen (90,91).

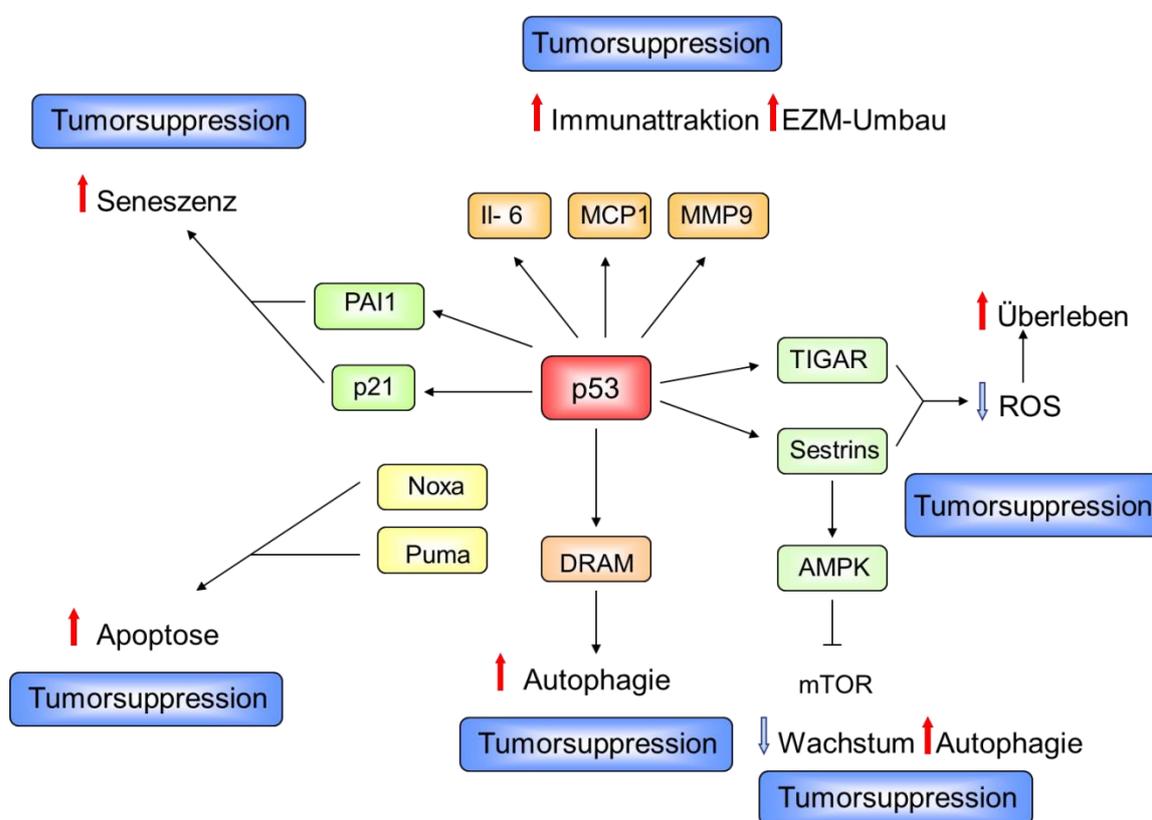


Abbildung 1.6: p53 Signalwege der Tumorsuppression. Über die Induktion seiner Zielgene reguliert p53 Zelltod und -überleben, Autophagie und ROS-Level, es beeinflusst das Immunsystem und die extrazelluläre Matrix. Der Haupteffekt der zahlreichen p53-Funktion liegt in der Tumorsuppression. Il-6, Interleukin 6; MCP1, monocyte chemotactic protein 1; MMP9, Matrixmetalloproteinase 9; TIGAR, TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator; AMPK, AMP-aktivierte Proteinkinase; DRAM, damage-regulated autophagy modulator; PUMA, p53 upregulated modulator of apoptosis; Noxa, PMAIP1, Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1; p21, CDK-Inhibitor 1; PAI1, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor; mTOR, mammalian target of Rapamycin; EZM, Extrazellulärmatrix.

1.4 p53 und Myc in der Lymphomogenese

1.4.1 Defekte des p53-Gens in der Lymphomogenese

In humanen B-Zell-Neoplasien ist p53 häufig mutiert oder funktionell dysreguliert. Es wurde gezeigt, dass Mutationen im p53-Gen mit einer Frequenz von ungefähr 12,5% in Lymphomen auftreten (92). Bestimmte Entitäten, wie das Burkitt Lymphom, zeigen höhere Frequenzen bis zu 41%. Bei der chronisch lymphatischen Leukämie ist die Mutation von p53 oder ein Verlust des Gens mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert (93). Schmitt und Kollegen zeigten am E μ -myc-Mausmodell (siehe 2.2.1.1), dass Myc-getriebene Lymphome, die durch Verpaarung heterozygot für p53 sind (p53+/-), nahezu ausnahmslos gegen das verbleibende p53-Allel selektiert wurden (p53null). Diese Lymphome zeigen Defekte in Apoptose und Seneszenz und wuchsen aggressiver als myc-getriebene Lymphome ohne definierte p53-Läsion (94).

Bei der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) gilt der Verlust von p53 als Risikofaktor. Bei der fortgeschrittenen CLL kommt es zur 17p-Deletion, durch die das p53 in CLL-Zellen fehlt. Dies führt in der Regel zu einem raschen Fortschreiten der CLL bzw. zu einem oft nur kurzzeitig anhaltenden Ansprechen auf die Standardbehandlung. Burkitt Lymphome, die durch Chromosomentranslokationen eine pathognomonische Myc-Aktivierung aufweisen, sind in etwa 30-60% mit p53 Mutationen assoziiert (95). Ähnlich häufig sind diese Mutationen in der L3-ALL zu finden, von der angenommen wird, dass sie einem leukämisch verlaufenden Burkitt Lymphom entspricht. Auch die chronische myeloische Leukämie (CML) zeigt im akzelerierten Stadium und der Blastenkrise häufig Mutationen des p53-Gens (96).

1.4.2 c-Myc Überexpression in Lymphomen

Das Proto-Onkogen c-myc kodiert für ein nukleäres Phosphoprotein, das als Transkriptionsfaktor Zellzyklus, Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose in Vertebratenzellen beeinflusst. In ruhenden, differenzierten Zellen ist die c-myc-Expression fast nicht detektierbar. Nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren wird c-myc jedoch aktiviert und bewirkt die Transkription pro-proliferativer Gene (97). Eine fehlerhafte Regulation des Gens führt zu einer konstitutiven, hohen Expression des c-myc-Gens und somit zu seiner ständigen Aktivität. Infolge der Fehlregulation des Gens kommt es zur Entstehung verschiedener Krebsarten. Somit wird aus dem Proto-Onkogen c-myc ein Onkogen. Eine mutierte, permanent exprimierte Version von myc

wird in vielen Krebszellen gefunden. Typisch für das Burkitt-Lymphom sind genetische Veränderungen, die das *myc*-Gen auf Chromosom 8 betreffen. Allerdings finden sich diese auch bei anderen malignen Lymphomen, insbesondere beim diffusen großzelligen B-NHL (DLBCL). Zytogenetisch findet man in der Mehrheit der Fälle folgende Chromosomentranslokationen: $t(8;14)$, $t(8;22)$ und $t(2;8)$. Allen 3 Translokationen ist gemeinsam, dass dabei das *myc*-Gen in die Nähe von Immunglobulin (*IG*)-Genen gelangt, und zwar in den Bereich der Immunglobulin-Schwerkette auf Chromosom 14 oder der Leichtketten kappa auf Chromosom 2 oder lambda auf Chromosom 22 (98). Die Expression des *myc*-Gens wird im Falle einer Translokation nicht mehr von dessen normalen DNA-Kontrollsequenzen auf Chromosom 8 sondern von den DNA-Kontrollsequenzen der Immunglobulin-Leicht- bzw. -Schwerketten gesteuert. Da die Leicht- und Schwerketten von Immunglobulinen in B-Zellen im Rahmen der Antikörperproduktion quasi ständig abgelesen und exprimiert werden, geschieht dies für das *Myc*-Gen und *Myc*-Protein ebenfalls (99). Dadurch kommt es zur Überexpression von *Myc*-Protein und zu einer fehlregulierten Zellteilung. Die Dysregulation des *myc*-Gens ist allein nicht ausreichend für die maligne Transformation, da eine alleinige Überexpression von *Myc* neben der Zunahme der Proliferationsrate vor allem auch zu einer Zunahme von *Myc*-abhängigen Apoptose-Mechanismen führt (100). Um die Situation beim Burkitt-Lymphom in einem transgenen Mausmodell zu simulieren, wurde ein Konstrukt aus dem *myc*-Gen und dem Schwerkettenenhancer in die Keimbahn der Maus überführt. Die Tiere entwickeln zwar Tumoren der B-Lymphozyten, nicht aber einen dem Burkitt-Lymphom vergleichbaren malignen Phänotyp (101). Ein aktiviertes *myc*-Gen reicht somit für eine volle maligne Transformation nicht aus. Erst durch zusätzliche Transfektion mit einem zweiten Onkogen, z.B. einem aktivierten *Ras*-Gen, wird in den Tieren eine schnelle maligne Transformation der B-Lymphozyten erreicht. Im Gegensatz zum Burkitt Lymphom, welches durch Translokation so gut wie immer mit einer Überexpression von *Myc* assoziiert ist, findet man bei dem genetisch heterogenen DLBCL nur in 5-10% der Fälle eine *myc*-Translokation, welche dann aber mit einem hohen Risiko und schlechtem Ansprechen auf Therapie kombiniert ist (102).

1.4.3 *Myc*-induzierte „failsafe“ Mechanismen

Überexpression von *Myc* aktiviert den ARF-Mdm2-p53 Tumorsuppressor-Signalweg (35). Im Gegensatz zu aktiviertem *Ras* löst c-*Myc* jedoch durch p53-Aktivierung

hauptsächlich Apoptose aus (103). p19ARF, das Produkt des alternativen Leserahmens des INK4a-ARF-Locus der Maus, stabilisiert p53 durch die Bindung an Mdm2 und die Antagonisierung dessen Funktion (31). Umgekehrt sind MEFs mit fehlender ARF- oder p53-Funktion resistent gegenüber Myc-induzierter Apoptose. MEFs, die Myc überexprimieren und überleben, weisen in der Regel entweder p53-Mutation, oder seltener, einen biallelischen ARF-Verlust auf (104). Unter bestimmten Bedingungen kann myc jedoch auch Seneszenz induzieren. So zeigten Grandori und Kollegen, dass die Überexpression von Myc in WRN- (Werner-Syndrom-Gen) defizienten Fibroblasten Seneszenz induziert, welche auch nicht durch die Überexpression von hTERT antagonisiert werden konnte (105). Auch die akute Wiederanschaltung von p53 in Apoptose-geschützten Lymphomzellen dekuvierte das pro-seneszente Potential von Myc, wie von unserer Arbeitsgruppe im E μ -myc-Maus-Lymphom-Modell in vitro und in vivo demonstriert (106).

1.5 Der PI3K – AKT – mTOR – Signalweg

Die Proteinkinasen B (PKB $\alpha/\beta/\gamma$) (Gene: *AKT1*, *AKT2*, *AKT3*), sind drei Enzyme, die eine Phosphatgruppe auf andere Proteine übertragen (Proteinkinasen). PKBs sind Proto-Onkogene und in Tumorzellen häufig überaktiv. Alle drei AKT-Gene kodieren für in ihrer Peptid-Sequenz hochgradig homologe Proteinkinase Isoformen AKT1/PKB α , AKT2/PKB β und AKT3/PKB γ . Sie besitzen eine N-terminale „Pleckstrin-Homologie“ (PH) Domäne, eine zentrale Kinase-Domäne, und eine C-terminale hydrophobe Domäne mit regulatorischer Funktion. „Upstream“ von AKT wird die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) durch extrazelluläre Signale oder z.B. durch Ras aktiviert und durch das als Tumorsuppressor häufig deletierte PTEN-Genprodukt negativ reguliert. Durch die Generierung des sekundären Botenstoffes PIP₃ aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) wird der sogenannten PI3K/AKT-Signalweg initiiert. AKT kann mit der PH-Domäne an PIP₃ binden und dadurch an die Zellmembran rekrutiert werden. Phlda3 verhindert diese Bindung. An der Zellmembran wird AKT von der Phosphoinositid-dependent Kinase-1 (PDK1) und einer weiteren Kinase an ihren Aminosäuren Serin(473) und Threonin(308) phosphoryliert und dadurch aktiviert. Aktiviertes AKT kann daraufhin diverse Substrate, unter anderem FOXOs und TSC2, phosphorylieren und dadurch aktivieren oder inhibieren. Die aktivierte Proteinkinase B (AKT) phosphoryliert und hemmt den Tuberous Sclerosis Complex (TSC) und hebt damit dessen hemmenden Einfluss auf mTOR auf. TSC besteht aus

zwei Proteinen, TSC1 (Hamartin) und TSC2 (Tuberin). TSC2 ist ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP), welches die mit Ras verwandte kleine GTPase Rheb (Ras-homolog-enriched-in-brain) durch Hydrolyse von GTP zu GDP inaktiviert, die wiederum mTOR aktiviert (107). mTOR ist eine Kinase, die für das Überleben, Wachstum, Proliferation und Motilität von Zellen entscheidend ist. Man kann zwei verschiedene mTOR Komplexe unterscheiden, mTORC1 und -2. Der mTORC1-Komplex besteht aus Raptor, PRAS40 und mLST8 und kontrolliert Zellwachstum und Proteinsynthese (107). Eine Aktivierung von mTORC1 führt zur Phosphorylierung von zwei Schlüsselproteinen, welche die Translation von Proteinen regulieren: 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) binding protein-1) und S6K1 (Protein S6 Kinase 1). mTORC2 (auch PDK2) hingegen setzt sich zusammen aus mTOR, Rictor, Sin1, PROTOR und mLST8 und kontrolliert das Aktin-Zytoskelett und Zellspreading (108). Nur mTORC1, nicht aber mTORC2 reagiert akut auf Rapamycin. Rapamycin inhibiert rasch mTORC1 durch Komplexierung mit FKBP12, kann aber eventuell nach längerer Zeit auch mTORC2 hemmen und damit die Phosphorylierung von AKT verhindern (109). mTORC1 wird aktiviert durch den Insulin/IGF1-PI3K-AKT-Signalfweg, den WNT-GSK3-Signalfweg und die ERK-RSK-Kaskade. Inhibiert wird der Komplex durch ungünstige metabolische Bedingungen und ein schädliches Milieu, also Nährstoffmangel, Hypoxie und DNA-Schaden, unter anderem via p53 (110–112). Die kontroverse Rolle des AKT-Signalfweges in der Induktion von Seneszenz wurde ausführlich in 1.1.4 diskutiert.

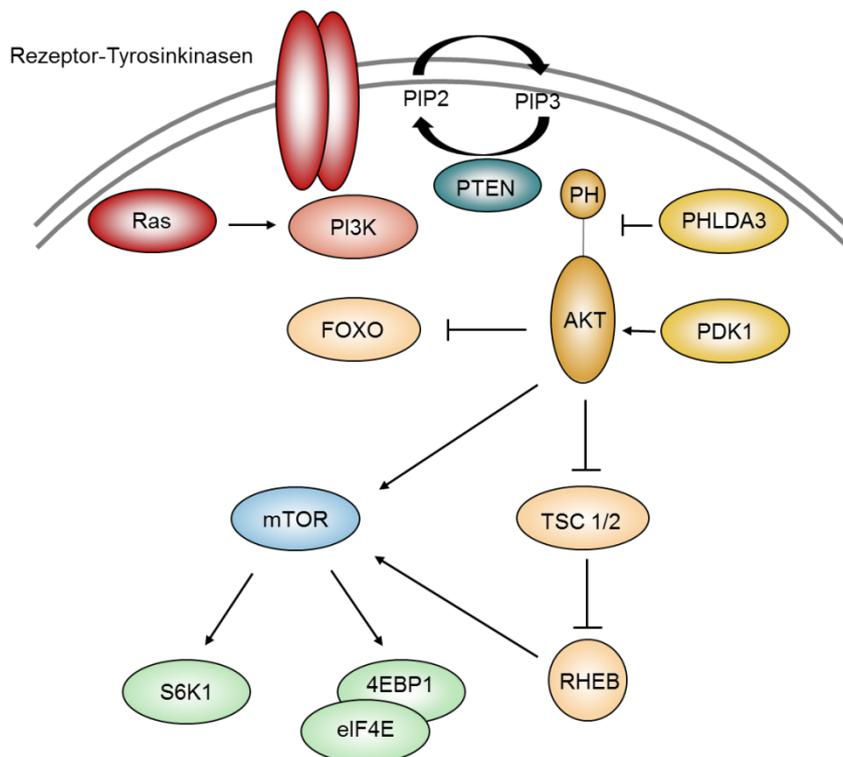


Abbildung 1.7 Darstellung des PI3K – AKT – mTOR – Signalwegs. Zur Dysregulation des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges kommt es durch exogene oder endogene Aktivierung. Exogene Faktoren umfassen die Aktivierung durch Ras, meist in gastrointestinalen Tumoren, während Rezeptor-Tyrosinkinase-Aktivierung in einer breiten Palette von hämatologischen und soliden Tumoren berichtet wurde. Zu den endogenen Faktoren gehören entweder die Kinase Aktivierung durch Gen-Mutation/Amplifikation oder der Verlust der PTEN-Funktion. eIF4E, eukaryotic initiation factor 4E; 4E-BP1, eIF4E-binding protein 1; FOXO, Forkhead-Box-Protein; mTOR, mammalian target of rapamycin; PDK1, Phosphoinositide-dependent Kinase-1; PHLDA3, pleckstrin homology like domain family A member 3; PIP, Phosphatidylinositol-bisphosphate; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PTEN, phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10; RHEB, Ras homologue enriched in brain; S6K1, Ribosomal protein S6 kinase beta-1; TSC, tuberous sclerosis (nach (113) und (114)).

1.6 Ziel dieser Arbeit

Signale, die das Fortschreiten des Zellzyklus auslösen, wie die Aktivierung von Myc und Ras, induzieren auch „Tumorfailsafe“-Programme, wie Apoptose und Seneszenz. Die maligne Transformation spiegelt also ein verlorenes Gleichgewicht zwischen aktivierten onkogenen Faktoren und eingeschränkten/defekten zellulären Failsafe-Maßnahmen wider. Ist eine Zelle bereits transformiert, so können u.a durch DNA-Schäden wie Bestrahlung oder Chemotherapie immer noch zelluläre Arrest- und Apoptoseprogramme ausgelöst werden. p53 ist dabei einer der wichtigsten Mediatoren der zellulären Wachstumskontrolle, in dem es die Progression an mehreren Zellzyklus

Checkpunkten kontrolliert und die Arrestprogramme Apoptose und Seneszenz auslösen kann.

Die Zahl bekannter p53 induzierbarer Gene ist in den letzten Jahren stark gewachsen, viele von ihnen sind jedoch noch wenig untersucht und ihre funktionelle Bedeutung ist damit unklar. Auch ist bisher nicht verstanden, wie p53 als Antwort auf verschiedene zelluläre Schäden und unterschiedliche „upstream“ Signale differenzielle Effektorprogramme – also Arrest, Seneszenz oder Apoptose – koordiniert. Da p53 komplex über Protein-Level, subzelluläre Lokalisation, Phosphorylierung, Azetylierung und weitere posttranslationale Modifikationen reguliert wird, könnte die Steuerung dieser Größen zur Aktivierung verschiedener transkriptioneller Ziele führen. Es sind zahlreiche Gene als pro-apoptotisch beschrieben worden, u.a. Noxa, Puma, Perp und Bax, während wesentlich weniger p53 Effektoren mit Zellzyklus arretierender Funktion bekannt sind. Dazu gehören p21 als G1- und 14-3-3- σ als G2/M-Arrest Vermittler (115,116). Die molekularen Mechanismen, welche zwischen temporärem und Langzeit-Zellzyklus-Arrest unterscheiden sind ebenso wenig verstanden wie die Differenzierung zwischen Apoptose und Seneszenz.

In dieser Arbeit soll in Lymphomzellen unterschiedlichen genetischen Ursprungs mittels Therapie-induzierter Seneszenz die Induktion von p53-Zielgenen und ihre Rolle in der Etablierung und Aufrechterhaltung zellulärer Seneszenz untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Software

Tabelle 2.1: verwendete Geräte

Gerät	Hersteller, Modell
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Peqlab
Gelanalyse	Gene Flash Syngene Bio Imaging
Chemilumineszenz Detektor	Fujifilm LAS-4000
Digitalkamera	Diagnostic Instruments SPOT RT
FACS-Gerät	Becton Dickinson FACSCalibur
Inkubator	Binder
Lichtmikroskop	Krüss MBL 3100
Mikrozentrifuge	Roth
Netzteil für die Elektrophorese	Consort 300V-500mA E835
PCR-Maschine	Eppendorf Mastercycler
Pipetten	Eppendorf Research
Real-Time PCR System	Applied Biosystems StepOne Plus
SDS-Gelelektrophoresekammer	C.B.S. Scientific
Sterilbank	Heraeus HERAsafe
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer comfort 1,5ml
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415D
Vortexer	Scientific Industries Vortex-Genie 2
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0R

Tabelle 2.2: Software

Anwendung	Software
Klonierung	APE-Plasmid
Becton Dickinson FACSCalibur	Cell Quest Pro
Fujifilm LAS-4000	ImageReader LAS-4000
Fotomikroskop	EVOSxl Core, Peqlab
Bildbearbeitung	IrfanView 4.20

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.3: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
30ml Luer-Lok Spritzen	BD Plastipak
Deckgläser, rund	Roth
FACS-Röhrchen	BD Falcon
Immobilon P Transfer Membran	Millipore
Multiguard Barrier Tips	Sorenson
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pipettenspitzen	Sarstedt
Polypropylen Rundbodenröhrchen	BD Falcon
Rotilabo Spritzenfilter, steril (45µm, PVDF)	Roth
Serologische Pipetten	TPP / Falcon
SuperFrost Plus Objektträger	R. Langenbrinck
Zellkulturschalen	TPP / Falcon
Zentrifugenröhrchen	BD Falcon

2.1.3 Allgemeine Substanzen, Lösungen und Puffer

Tabelle 2.4: Chemikalien – Trockensubstanzen und Lösungen

Chemikalie	Hersteller
1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)-Octan (DABCO)	Sigma
1kb-Marker	New England BioLabs

2-Propanol	Merck
4-Hydroxytamoxifen	Sigma
Acrylamid	Roth
Adriamycin	Apotheke Charité, CVK
Agar-Agar	Roth
Agarose	Serva
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth
Ammoniumpersulfat	Roth
Ampicillin	Roth
Aprotinin	Sigma
Bromphenolblau	Eurobio
BSA 100x (10mg/ml)	New England BioLabs
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Roth
Chloroform	Roth
Cyclophosphamid	Sigma
Chloroquin	Sigma
DEPC-Wasser	Roth
Dextrose	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
Dulbecco's Modified Eagle Medium 1x (DMEM) mit 4,5g/l Glucose, L-Glutamin und Pyruvat	GIBCO
EDTA	Roth
Ethanol, 70% vergällt	Roth
Ethanol, 96%	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma / Roth
FBS	GIBCO
Glutardialdehyd	Roth
Glycerol	Roth
Glycin	Serva
HCl (37%)	Roth
HEPES	Roche

IMDM	GIBCO
K ₃ [Fe(CN) ₆] (Kaliumferricyanid)	Sigma
K ₄ [Fe(CN) ₆] x 3H ₂ O (Kaliumferrocyanid)	Sigma
Kaliumacetat	Roth
KCl	Merck
L-Glutamin (200mM)	Biochrom AG
Metformin	Sigma
Methanol	J.T. Baker
MgCl ₂ x 6H ₂ O	Roth
Milchpulver	Roth
Na ₂ B ₄ O ₇ (Natriumborat)	Sigma
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck
NaCl	Merck / Roth
NaOH	Roth
Na-Orthovanadat	Sigma
Natriumazid	Roth
Nonidet P-40	Fluka
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas
Paraformaldehyd	Sigma
pBR 328 Mix I DNA-Marker	Roth
PBS	Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin (10000U/ml)	Biochrom AG
Ponceau S	Roth
Polybren (Hexadimethrin-Bromid)	Aldrich
Polyvinylalkohol 4-88 (Mowiol)	Sigma
Propidiumiodid	Fluka
Puffer für die Restriktionsenzyme	New England BioLabs
Puromycin	Invivogen
Rapamycin	LC Laboratories
RNaseA	AppliChem
Rnasin Ribonuclease Inhibitor	Promega
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Roth

Roti-Quant Bradford-Reagenz	Roth
SDS	Roth
Triciribine	Selleckchem
Tris	Merck
Triton X-100	Merck
TRIzol	Invitrogen
Trypan Blue Solution	Sigma
Trypsin (2,5% w/v in PBS)	Biochrom AG
Tween 20	Roth
X-Gal	Roth
β -Mercaptoethanol	Roth

Tabelle 2.5: Verwendete Puffer und deren Bestandteile

Puffer	Zusammensetzung
PBS	Dulbecco instamed 9,55 g/l
2x HBS (HEPES buffered saline)	280mM NaCl (1,6g)
pH 7,05	10mM KCl (0,074g)
	1,5mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (0,0213g)
	12mM Dextrose (0,2g)
	50mM HEPES (1g)
	dH ₂ O (100ml), pH 7,05 mit 0,5 NaOH
DNA-/RNA Verarbeitung	
DNA-Lysepuffer	100mM Tris-HCL pH 8,5
	5mM EDTA
	0,2% SDS
	200mM NaCl
50x TAE	242 Tris Base
	57,1ml Acetic acid
	100ml 0,5M EDTA (pH 8,0)
	auf 1l mit H ₂ O auffüllen

DNA Ladepuffer	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylen Cyanol 30% Glycerol in dH ₂ O
----------------	--

Westernblotting

10x TBS	24,23g Tris HCL 80,06g NaCl 800ml H ₂ O, pH 7,6
Proteinlysepuffer	5M NaCl 1M Tris-HCl pH 7,5 0,5 M EDTA NP-40 0,5% Zu 1ml jeweils frisch dazu geben : 1µl Aprotinin 2 µl Leupeptin 2 µl DTT 5 µl Na-Orthovanadat
Trenngelpuffer	H ₂ O 30% Acrylamidmix 1,5M Tris (pH8,8) 10% SDS 10% Ammonium Persulfat TEMED
Sammelgelpuffer	H ₂ O 30% Acrylamidmix 1,0 M Tris (pH 6,8) 20% SDS 10% Ammonium Persulfat TEMED
Laemmli Ladepuffer	2% SDS 50mM Tris-HCl pH 6,8 0,2 mg/ml Bromphenolblau 0,1M DTT, 10% Glycerol in dH ₂ O

Stripping Puffer	H ₂ O, 40,5 ml Glycin pH 2,5, 7,5 ml 10% SDS, 2ml
SDS-Laufpuffer (10x)	60,57 Tris Base 288,27g Glycin 5ml 20% SDS auf 1 Liter
Semi-Dry-Blotpuffer (1x)	60,57 Tris Base 288,27g Glycin 200 ml Methanol auf 1 Liter
Blockpuffer	5% Milchpulver in PBS

Färben und Fixieren

Mowiol Mounting Medium	Polyvinylalkohol 4-88 (Mowiol) 1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)-Octan (DABCO), DAPI 0,2M Tris-HCl pH 8,5 Glycerol
2NHCL/0,5% Triton	83,33ml konz. HCl (37%), 2,5 ml Triton X-100 ad 500ml dH ₂ O
0,1M NaB ₄ O ₇	19,07g Na ₂ B ₄ O ₇ ad 500ml dH ₂ O pH mit HCl auf 8,5 einstellen
Inkubationspuffer für BrdU-Antikörperfärbung	0,5% Tween 20 1% BSA in PBS
PBS/MgCl ₂	PBS mit 1mM MgCl ₂ , pH 5,5 (rodent cells)
SA-β-Gal-Fixierlösung	Paraformaldehyd 2% Glutardialdehyd 0,25% PBS
20x Kaliumcyanidlösung	820mg K ₃ Fe(CN) ₆ 1,050mg K ₄ Fe(CN) ₆ x 3H ₂ O in 25ml PBS
40x X-Gal	40mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid (X-Gal)

SA- β -Gal-Inkubationslösung	in 1ml N,N-Dimethylformamid Für 10ml: 9,3ml PBS/MgCl ₂ (pH 5,5) 0,5ml 20x Kaliumcyanidlösung 0,25ml 40x X-Gal
------------------------------------	--

Arbeiten mit Bakterien

Mini Prep Lösung 1	Entspricht P1 Puffer (Quiagen Maxi Prep)
Mini Prep Lösung 2	Entspricht P2 Puffer (Quiagen Maxi Prep)
Mini Prep Lösung 3	Entspricht P3 Puffer (Quiagen Maxi Prep)

Tabelle 2.6: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
TaqMan Mastermix	Applied Biosystems
Maxi Prep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraxtion Kit	Qiagen
Click-iT® AHA Alexa Flour 488 Protein Synthesis HCS Assay	Invitrogen

2.1.4 Medien

Tabelle 2.7: Zellkulturmedien

Medium	Hersteller	Zusätze
DMEM	Gibco	10% FBS 1% Penicillin/Streptomycin
IMDM	Gibco	
B-Zell-Medium	Gibco	1:1 DMEM + IMDM 10% FBS 2% -L-Glutamin 0,0087% β -Mercaptoethanol 1% Penicillin/Streptomycin

Medium zur Kryokonservierung	Gibco	50% FBS 40% B-Zell-Medium 10% DMSO
---------------------------------	-------	--

Tabelle 2.8: Medien für die Bakterienkultivierung

Medium	Zusätze
LB-Medium	10g/l Trypton 5g/l Hefe 10g/l NaCl in H ₂ O
LB-Amp-Medium	LB-Medium 100µg/ml Ampicillin
LB-Amp-Agar	10 g/l Trypton 5g/l Hefe 10g/l NaCl 15g/l Agar Agar in H ₂ O nach dem Autoklavieren auf 50°C gekühlt und 100µg/ml Ampicillin

2.1.5 Vektoren

Tabelle 2.9 Vektoren/Plasmide

Name	Beschreibung
MSCV-bcl2- GFP	Murine bcl2 cDNA im retroviralen Vektor pMSCV-2.2-IRES-GFP
pSUPER.retro	Vector System zur Expression von Short Interfering RNA, Oligo Engine

2.1.6 Antikörper

Tabelle 2.10: Verwendete Primärantikörper für Western Blots und Facs

Targetprotein	Klonalität	Hersteller	Spezies	Verdünnung
Anti-bromodeoxyuridine, mouse IgG ₁ Alexa Fluor 488 conjugate	monoklonal	Invitrogen	Mouse	Facs 1:15
Histone H3 (tri-methyl K9)	polyklonal	abcam 8898	Rabbit	WB 1:5000
p21 (C-19)	polyklonal			WB 1:500
p53-Protein (CM5)	polyklonal	Leica Microsystems	Rabbit	WB 1:1000
Phospho-p53 (Ser 15)	polyklonal	Cell Signaling Technology	Rabbit	WB 1:1000
Puma	Polyklonal	Abcam	Rabbit	WB 1:1000
Phospho-AMPK α (Thr172)	Monoklonal	Cell Signaling	Rabbit	WB 1:1000
AMPK α	Polyklonal	Cell Signaling	Rabbit	WB 1:1000
phospho-AKT (S473)	polyklonal	Cell Signaling	Rabbit	WB 1:1000
AKT	polyklonal	Cell Signaling	Rabbit	WB 1:1000
phospho-Foxo3 (S253)	Polyklonal	Cell Signaling	Rabbit	WB 1:1000
Foxo3a	Polyklonal	Abcam	Rabbit	WB 1:1000
Phospho-Rb (Ser780)	Polyklonal	Cell Signaling	Rabbit	WB 1:1000
phospho-p70S6Kinase (Thr389)	Monoklonal	Cell Signaling	Rabbit	WB 1:1000
p70S6Kinase	Monoklonal	Cell Signaling	Rabbit	WB 1:1000

phospho-S6				
Ribosomal Protein (Ser240/244)	monoklonal	Cell Signaling	Rabbit	WB 1:1000
S6	Monoklonal	Cell Signaling	Rabbit	WB 1:1000
Phospho 4E-BP1 (S65)	Polyklonal	Cell Signaling	Rabbit	WB1:1000
4E-BP1	Polyklonal	Cell Signaling	Rabbit	WB 1:1000
LC3	Monoclonal	Nano Tools	Mouse	WB 1:1000
ER-alpha	Polyklonal	Santa Cruz	Rabbit	WB 1:1000
Tubulin	Monoklonal	Sigma	Mouse	WB 1:2000

Tabelle 2.11: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blots/Facs

Reaktivität	Spezies	Konjugat	Hersteller	Verdünnung
Anti-mouse IgG	Schaf	HRP	GE Healthcare	1:2000
Anti-rabbit IgG	Schaf	HRP	GE Healthcare	1:1000

2.1.5 Enzyme

Tabelle 2.12: Verwendete Enzyme

Enzym	Aktivität	Hersteller
EcoR1	20.000 U/ml	New England BioLabs
Bgl2	10.000 U/ml	New England BioLabs
HindIII	20.000 U/ml	New England BioLabs
BglII	10.000 U/ml	New England BioLabs
Proteinase K	50–100 µg/ml	Merck
RNAse A	90 U/mg	Roth
SuperScript II Reverse Transkriptase	200 U/µl	Invitrogen

T4 DNA Ligase	400.000 U/ml	New England BioLabs
DNA Polymerase	5U/μl	Applied Biosystems

2.1.6 TaqMan[®]-Sonden

Tabelle 2.13: Verwendete TaqMan[®] Sonden

Ziel-Gen	Applied Biosystems Assention number
14-3-3sigma	Mm01180869_s1
Abc7	Mm01235258_m1
alpha(II)PH	Mm00433237_m1
ARF	Mm00494449_m1
ASNS	Mm00803785_m1
ATF3	Mm00476032_m1
Atg4b	Mm00558047_m1
Atg7	Mm0051229_m1
Bax	Mm00432050_m1
Bcl2	Mm02528810_s1
Bcl6	Mm00477633_m1
Biglycan	Mm00455918_m1
BTG2	Mm00476162_m1
CCN3	Mm00456855_m1
CD133/Prom1	Mm00477115_m1
CD44	Mm01277163_m1
CDK1(Cdc2a)	Mm00772471_m1
Col1A1	Mm01302043_g1
Cspg2	Mm01283063_m1
CTGF	Mm01192933_g1
Cxcl1	Mm01354329_g1
Cxcl14	Mm00444699_m1
Cxcl16	Mm00469712_m1
cxcl5	Mm00436451_g1
Cxcr2/Il8rb	Mm99999117_s1
Cxcr6	Mm02620517_s1
Cyclin A/Ccna1	Mm00432337_m1
Cyclin D/Ccnd1	Mm00432358_g1
Cyclin E/Ccne1	Mm00432367_m1
Cyclin G1	Mm00438084_m1
Dcbl2	Mm00472304_m1
Decorin	Mm03003496_s1
Dhfr	Mm00515662_m1
DR5	Mm00457866_m
EGR1	Mm00656724_m1
Fas	Mm00433237_m1
FBXW7	Mm00504452_m1
FDXR	Mm00433249_m1

Foxo3a	Mm00490673_m1
Gadd45	Mm00432802_m1
GEF-H1	Mm00434757_m1
GM-CSF	Mm99999059_m1
HNRNPA1	Mm02528230_g1
HZF	Mm01305863_m1
ID1	Mm00775963_g1
ID2	Mm01293217_g1
IGF-1 receptor	Mm00802831_m1
Igfbp6	Mm00599696_m1
Igfbp7	Mm00514987_m1
Il6	Mm99999064_m1
IL7-receptor	Mm00434295_m1
Ki67	Mm01278609_m1
Kitl	Mm00442972_m1
Map1LC3	Mm00782868_sH
Maspin/Serpib5	Mm00436763_m1
MCP1/Ccl2	Mm00441243_g1
Mdm2	Mm00487656_m1
Mdr-1/Abcb1b	Mm01324120_m1
Mip3alpha/Ccl20	Mm00444228_m1
Mmp2	Mm00439506_m1
Mmp3	Mm01168406_g1
NFKB2	Mm00479807_m1
NIMA/Nek7	Mm00480722_m1
Notch1	Mm00627192_m1
Noxa	Mm00451763_m1
P21 CIP1	Mm00432448_m1
P53	Mm00441964_g1
PAI-1/Serpine1	Mm00436753_m1
PERP	Mm00480750_m1
phlda3	Mm00449846_m1
PIDD	Mm00502614_m1
PIG3/nqo1	Mm00500821_m1
PKCb/Prkcb1	Mm00435749_m1
Prdx4	Mm00450261_m1
Pri3/Ptp4a3	Mm00477233_m1
PTGF-beta/Gdf15	Mm03024231_s1
Puma	Mm00519268_m1
REDD1	Mm00512504_g1
Rrmb2/p53R2	Mm01701793_g1
SA-b-Galactosidase	Mm00515342_m1
SAK/Plk4	Mm00550358_m1
Sestrin/Sesn2	Mm00460679_m1
SGK3	Mm00453797_m1
Sirt1	Mm00490758_m1
Siva1	Mm00834449_g1
Slug/Snai2	Mm00441531_m1
Stat2	Mm00490880_m1
Stk4	Mm00451755_m1

Survivin	Mm00599749_m1
Suv39h1	Mm00468952_m1
Tgfb1	Mm03024053_m1
Thrombospondin1	Mm00449032_g1
Thrombospondin2	Mm01279240_m1
Tigar	Mm00621530_m1
TSC2	Mm00442004_m1
VEGF-A	Mm01281447_m1
VEGF-R1	Mm01210866_m1

Tabelle 2.14: Verwendetet PCR-Primer

Primer	Sequenz 5' - 3'
P53ER-PCR:	
P53ln10_F	CCT CCA GCC TAG AGC CTT CCA AGC
P53_R	GGT GAG ATT TCA TTG TAG GTG CC
ER_R	GCA CAC AAA CTC TTC ACC CTG C
P53-LOH-PCR:	
X7	TAT ACT CAG AGC CGG CCT
X6,5	ACA GCG TGG TGG TAC CTT AT
Neo	TCC TCG TGC TTT ACG GTA TC
sh-Tsc2	GCACGGAGCACCAAGTCTTAAT

2.2 Methoden

2.2.1 Mausmodelle

2.2.1.1 Das E μ -Myc-Maus-Modell

Um pathogenetische Mechanismen bei der Lymphomentstehung nachahmen zu können, wurden zahlreiche transgene Mausmodelle etabliert.

E μ -myc-transgene Mäuse sind für das Onkogen c-myc transgen und liegen im Inzuchtstamm C57Bl/6 vor. C-myc ist ein Transkriptionsfaktor, der in den meisten Zelltypen Zellwachstum und Proliferation stimuliert, terminale Differenzierung inhibiert und Zellen gegenüber Apoptosesignalen sensitiviert (117). In den E μ -myc-transgenen Mäusen wird c-myc konstitutiv in der B-Zellreihe überexprimiert. Diese Überexpression ist B-Zell-restringiert, da das c-myc Gen an den für B-Zellen charakteristischen Immunglobulin-schwere-Ketten-Enhancer E μ gekoppelt ist (99). Das E μ -myc-Transgen entspricht der t(8;14)-Translokation, wie sie häufig in humanen Burkitt-Lymphomen mit dereguliertem myc vorliegt. E μ -myc-transgene Mäuse entwickeln binnen weniger Monate spontan klonale B-Zell-Lymphome mit Begleitleukämie; diese Lymphome ähneln damit dem humanen Burkitt Lymphom bzw. der reifzelligen FAB-L3-B-ALL oder auch dem (Myc-Bruchpunkt-positiven) DLBCL. Die reifzellige B-ALL ist eine Sonderform der ALL und kann als die leukämische Manifestation des Burkitt-Lymphoms betrachtet werden.

2.1.1.2 Die p53-Knockout-Maus

1992 publizierten Donehower und Kollegen erstmalig ihre Untersuchungen an der von ihnen entwickelten p53-Knockout-Maus. Sie beobachteten, dass sich die Tiere normal entwickeln, jedoch zur Entwicklung von Tumoren neigen. Nach 6 – 9 Monaten sterben die Tiere, meist an Sarkomen und Lymphomen. Bei der p53-Knockout-Maus wurde eine Keimbahnmutation in den p53-Genlocus eingebracht, indem zwischen Exon 2 und 7 des p53 Gens ein Neomycinresistenzgen eingeschleust wurde (Neo Kassetten) (68). Damit wurden ca. 40% der kodierenden Sequenz entfernt, wodurch das Protein seine Wirkung komplett verliert (118). Außerdem ermöglicht das Konstrukt eine einfache Detektierbarkeit mittels PCR.

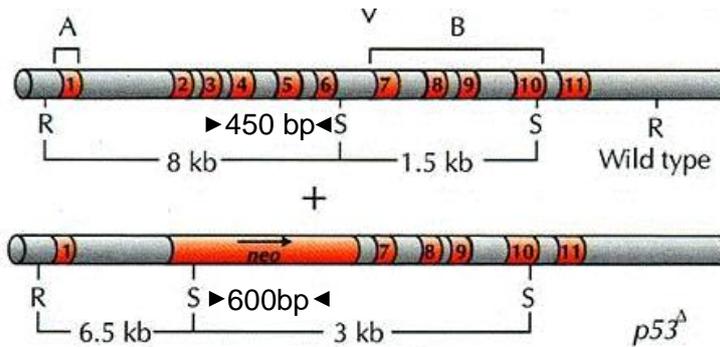


Abbildung 2.1 Das p53-Knockout-Konstrukt. Eine Keimbahnmutation, in der die kodierende Sequenz von Exon 2 bis 6 durch eine Neo-Kassette ersetzt wurde, verhindert die Expression von funktionalem p53. Spezifische Primer dienen der Detektion des Wildtyp- oder Knockout-Genotypes (markiert durch Pfeilspitzen). (118)

In unserem Labor nutzen wir das von T. Jackson 1994 publizierte p53-Knockout-Mausmodell (siehe Abbildung). Die p53-Knockout-Maus bietet die Möglichkeit, die Tumorgenese und Tumorthherapie mit unterschiedlich genetischen Modifikationen zu untersuchen. So sind beispielsweise E μ -myc-transgene, p53null Mäuse nicht viabel und sterben schon in utero. E μ -myc-transgene Mäuse mit heterozygotem p53 Status entwickeln sich dahingegen normal, sterben jedoch früh an malignen Lymphomen, wobei das verbliebene p53-Wildtyp-Allel während der Lymphomogenese inaktiviert wird (Loss of heterozygosity – LOH) (94).

2.2.1.3 Das p53^{ERTam}-Maus-Modell

Es gibt mittlerweile eine große Auswahl von Methoden, die es erlauben, bestimmte Gene funktionell zu charakterisieren. Für detaillierte Studien zur Genfunktion, besonders zur zeitlichen Sequenz der durch das Genprodukt in Gang gesetzten intrazellulären Prozesse dienen ligandenabhängige Fusionsproteine, also künstliche molekulare Schalter. Zelluläre Prozesse werden durch diese Schalter zeitlich kontrollierbar und unter Umständen sogar reversibel.

Die Fusion der Hormon-Bindedomäne (HBD) von Steroidhormon-Rezeptoren, wie zum Beispiel dem Östrogen-Rezeptor (ER), an heterologe Proteine ist eine Möglichkeit, diese Proteine ligandenabhängig regulierbar zu machen (119). Für die molekularbiologische Anwendung wurde die ER-HBD durch Mutation so modifiziert, dass nur noch der künstliche Ligand 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT, TAM), nicht aber der natürliche Ligand 17- β -Oestradiol gebunden werden kann (120).

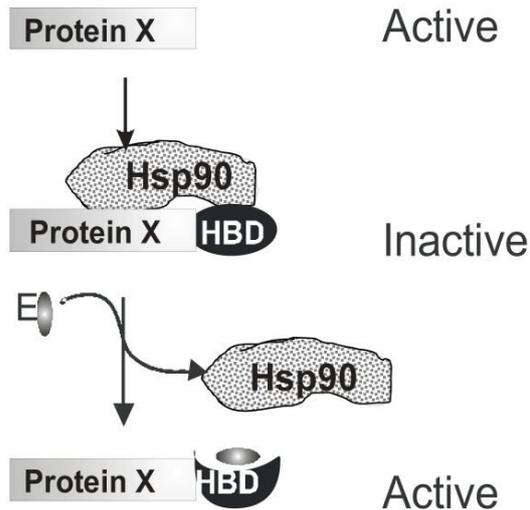


Abbildung 2.2 Mechanismus der Regulation von Fusionsproteinen. Ohne Stimulation von 4-OHT binden und inaktivieren Hitzeschockproteine den ER-Rezeptor und sein fusioniertes Protein. 4-OHT verdrängt diese aus der Bindung mit der HBD und aktiviert somit ProteinX. (121)

Wie die ER-HBD die heterologen Proteine reguliert, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Das verbreitete Modell ist das einer sterischen Inhibition in Abwesenheit des Liganden 4-OHT. Nukleare Rezeptoren wie der Östrogen-Rezeptor liegen in Abwesenheit ihres Liganden an Heat-Shock-Proteine (HSP) komplexiert im Zytoplasma vor und sind dadurch inaktiviert. Durch Ligandenbindung wird die Assoziation mit den Heat-Shock-Proteinen aufgehoben. Die heterologen Proteine sind nun frei mit anderen Bindungspartnern zu assoziieren und werden so aktiviert.

Evan und Kollegen züchteten eine Knockin-Maus ($p53^{KI/KI}$), in der beide $p53$ Allele durch das induzierbare $p53^{ERTam}$ ersetzt wurden (122). Dieses Mausmodell ermöglicht die Modulation des $p53$ -Status von Wildtyp zu Knockout nach Belieben durch Aktivierung von $p53$ durch Tamoxifen. Die Verpaarung von $E\mu$ -myc-transgenen Mäusen mit $p53^{ERTam}$ -transgenen Mäusen ($p53^{KI/+}$) ermöglicht genauere Untersuchungen der $p53$ Funktion in der Tumorgenese myc-getriebener Lymphome. In Lymphomen, die sich in diesen Tiere entwickelten, konnten sowohl ein LOH des $p53$ wt-Allels (45%), als auch Punktmutationen in der DNA-Bindedomäne von $p53$ nachgewiesen werden. Das verbleibende Allel bleibt jedoch aktivierbar und erlaubt nähere Untersuchungen der $p53$ Funktion (123).

2.2.2 Zellbiologische Methoden

Um Kontaminationen durch Pilze und Bakterien zu vermeiden, wurden Zellkulturarbeiten ausschließlich an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Zellen

wurden in CO₂-Inkubatoren bei 37°C und 21% O₂-Gehalt, sowie 5% CO₂-Gehalt in gesättigter Wasserdampfatosphäre (85%) kultiviert.

2.2.2.1 Lymphomzellgewinnung und –kultur

Die Entwicklung von Lymphomen wurde von Mitgliedern der Arbeitsgruppe in regelmäßigen Abständen überprüft. Die Mäuse wurden euthanasiert, wenn die Lymphknoten größer als 5mm im Durchmesser waren und somit ein ausgeprägtes Lymphom anzeigten. Die Mäuse wurden mittels CO₂-Inhalation und zervikaler Dislokation getötet. Die Tumoren wurden präpariert, in PBS zerkleinert und durch einen 35 µm Nylonfilter von bindegewebigen Anteilen des Lymphknotens separiert.

Die gewonnenen Lymphomzellen wurden in B-Zell-Medium als Suspensions-Zellen kultiviert. Die Zellkultur erfolgte auf arretierten 3T3-Zellen, sogenannten „Feeder-Zellen“, durch welche das B-Zell-Medium konditioniert wird. Je nach Experiment wurden die primären Lymphomzellen für mehrere Tage in einem Inkubator bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂ und 21% O₂ in 6-well Zellkulturplatten mit 3 ml B-Zell Medium kultiviert.

2.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Eukaryotische Zellen werden zur längerfristigen Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dafür wird ein DMSO-haltiges Einfriermedium verwendet, da DMSO durch seine hygroskopischen Eigenschaften die Bildung von Eiskristallen unterbindet und damit der Schädigung von Zellen vorbeugt.

Zum Auftauen wurden die Lymphomzellen sofort nach dem Auftauen des Mediums bei Raumtemperatur in 5ml Medium resuspendiert und 5 min bei 1200rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 1ml Medium resuspendiert und auf eine 6-well Zellkulturschale mit je 2 ml konditionierten Medium pro well ausplattiert.

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese pelletiert und in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in einem Kryotube mittels eines speziellen Kryobehälters (4°C Isopropanol-gefüllt) graduell auf -80°C hinuntergekühlt. Nach mindestens 24h bei -80°C im Kryobehälter wurden die Kryotubes in flüssigen Stickstoff überführt. Dieses Vorgehen gilt für alle verwendeten Zelltypen.

2.2.2.3 Wirkstoffbehandlung der Lymphomzellen

Doxorubicin (a.k.a. Adriamycin, ADR) Behandlung - Myc-transgene, bcl2-transduzierte Lymphomzellen wurden in 4 ml B-Zell-Medium mit 0,05 µg/ml Doxorubicin für 3 Tage kultiviert. Nach Kultur in Zytostatika freiem Medium für weitere zwei Tage beobachtete man prämatüre Seneszenz, so genannte Therapie induzierte Seneszenz. Doxorubicin wirkt als Interkalans in DNA und RNA. Die DNA-Synthese wird gestört, die Topoisomerase II gehemmt und es erfolgt eine Radikalbildung. Doxorubicin findet als Zytostatikum Anwendung bei der Behandlung verschiedenster Tumoren, unter anderem bei den Non-Hodgkin-Lymphomen.

Tamoxifen Behandlung – Myc,p53^{ERTam}-transgene, bcl2-transduzierte Lymphomzellen wurden in 3ml B-Zell Medium mit 1µM Tamoxifen, gelöst in 96% Ethanol, für 5 Tage (jeden zweiten Tag) behandelt. Dabei wird die Tamoxifen Stocklösung in einer Endkonzentration von 1:10000 eingesetzt. Die Kontrollen wurden nur mit Ethanolhaltigem Lösungsmittel behandelt. Medium inklusive Reagenz wurden bei Bedarf gewechselt, wobei die Behandlung bis zum fünften Tag durchgeführt wurde. Tamoxifen ist ein nichtsteroidales Antiöstrogen. Es wirkt als kompetitiver Antagonist, indem es sich spezifisch an Östrogenrezeptoren anlagert. Es wird als Arzneistoff zur Therapie von Mammakarzinomen eingesetzt. In der Molekularbiologie dient Tamoxifen der Ligandenabhängigen Regulation heterologer Proteine. Zudem stimuliert Tamoxifen Autophagie in der MCF7 Brustkrebs-Zelllinie durch Erhöhung des intrazellulären Niveaus von Ceramid (124).

Rapamycin Behandlung - Myc-transgene, bcl2-transduzierte Lymphomzellen wurden in 3ml Medium kultiviert. Sie wurden an Tag 0 mit 5µM Rapamycin behandelt, sowie an Tag 3 mit halber Dosis, also 2,5µM Rapamycin. Rapamycin wurde in Ethanol gelöst. Dabei wurde die Rapamycin Stocklösung in einer Endkonzentration von 1:5000 bzw. 1:7500 eingesetzt. Die Kontrolllymphome wurden mit Ethanol behandelt. Rapamycin ist ein Immunsuppressivum mit Makrolidstruktur (makrozyklisches Lacton) und wurde aus dem Streptomyzeten *Streptomyces hygroscopicus* isoliert. Rapamycin inhibiert eine Reihe von Zytokin vermittelten Signaltransduktionswegen durch Komplexbildung mit dem Protein mTOR (mammalian target of rapamycin). In der Medizin findet es Anwendung als Immunsuppressivum nach Nierentransplantationen. Seine antiproliferative Wirkung nutzt man zur Verhinderung von Restenosen nach Stentimplantation und aufgrund seiner antiproliferativen Effekte auf Zellen rückte

Rapamycin auch ins Blickfeld der Antitumorthherapie, da es vermutlich sowohl das Wachstum, als auch die Neovaskularisation bestimmter Tumore zu hemmen vermag. Rapamycin-resistente Lymphome wurden generiert, indem jeden zweiten Tag mit Rapamycin behandelt wurde, bis kein Effekt mehr auf die Proliferation beobachtet werden konnte. Dabei wurde in aufsteigender Dosierung behandelt. Begonnen wurden mit jeweils 2 Behandlungen mit 2,5 μ M und 3 μ M. Anschließend wurde mit 5 μ M weiterbehandelt, wobei das Zellkultur-Medium jeden 4. Tag gewechselt wurde. Der arretierende Effekt von Rapamycin war nach 25 Tagen Behandlung nicht mehr nachweisbar.

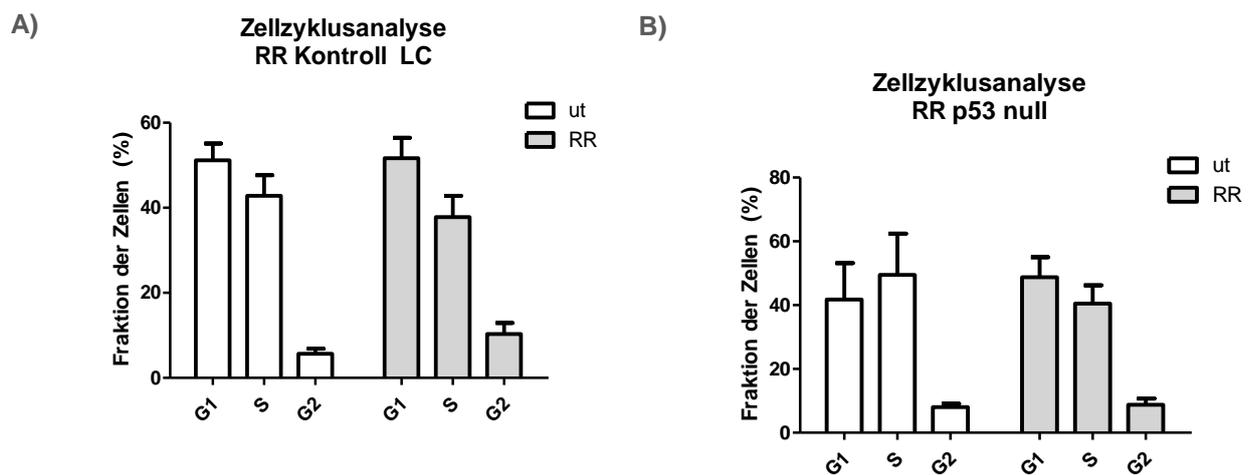


Abbildung 2.3 Rapamycin-resistente (RR) Lymphome A) Nach Behandlung mit Rapamycin in aufsteigender Dosierung über 25 Tage ist kein Effekt mehr auf den Zellzyklus nachweisbar B) Auch in p53 defizienten Lymphomen wird nach 25 Tagen Behandlung eine Rapamycin Resistenz beobachtet.

Metformin Behandlung - Myc-transgene, bcl2-transduzierte Lymphomzellen wurden in 3ml Medium kultiviert. Das Metformin wurde in einer Konzentration von 30mM eingesetzt, gelöst in PBS. Die Behandlung erfolgt entweder nur mit Metformin oder in Kombination mit dem AKT-Inhibitor Triciribine, wobei jeweils an d0 und an d2 nach Mediumwechsel mit der jeweiligen Einzelsubstanz behandelt wurde. Die Kombinationsbehandlung erfolgte ausschließlich an d0. Metformin ist ein Antidiabetikum, das den Blutzuckerspiegel senkt und die Insulinempfindlichkeit verbessert. Seine metabolischen Effekte, einschließlich der Hemmung der hepatischen Gluconeogenese, werden zumindest teilweise durch die Aktivierung des LKB1–AMPK α -Signalwegs vermittelt. Die Aktivierung dieses Weges erscheint auch bei der antiproliferativen und proapoptischen Aktivität von Metformin in Krebszelllinien

beteiligt zu sein. Metformin wurde in dieser Arbeit mit dem Ziel der AMPK α -Aktivierung und konsekutiven mTOR-Inhibition eingesetzt.

AKT-Inhibitor Behandlung – Myc-transgene, bcl2-transduzierte Lymphomzellen wurden in 3ml Medium kultiviert. Behandelt wurde mit dem AKT-Inhibitor Triciribine (TCN). Der Stock wurde in DMSO verdünnt. Es wurde mit 1 μ M bzw. 5 μ M behandelt, wobei die Verdünnung mit Medium erfolgte, so dass eine Kontrollbehandlung nicht erforderlich war. Triciribine ist ein hochselektiver, reversibler AKT-Inhibitor, der die Phosphorylierung und somit Aktivierung von AKT1/2/3 selektiv hemmt (125). *In vivo* bindet TCN an die PH-Domäne von AKT und verhindert somit seine Rekrutierung an die Plasmamembran und die anschließende Phosphorylierung an T308 und S473. TCN hemmt jedoch nicht die Kinase-Aktivität von AKT und unterbindet nicht die Phosphorylierung von AKT durch PDK-1 oder mTOR *in vitro*. TCN ist ein trizyklisches Nukleosid, welches in Zellen durch die Adenosin-Kinase in sein Monophosphatderivat phosphoryliert wird. TCN-P ist der aktive Metabolit von TCN (126).

2.2.2.4 Phoenix-Zell-Kultur

Phoenix-Zellen wurden auf Grundlage von 293T-Zellen, einer menschlichen, embryonalen Nierenzelllinie, designed (Labor von G. Nolan; Stanford Universität). Das einzigartige Merkmal dieser Zelllinie ist die hohe Transfektionsrate bei der Kalzium-Phosphat-Transfektion. Sie können zur Produktion von entweder ecotropen (nagerzellpathogene) oder amphotropen (säugerzellpathogene) Retroviren genutzt werden. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich ecotrope Viren hergestellt. Die Phoenix-Verpackungszelllinie wurde in 10cm Zellkulturplatten mit 10ml 3T3-Medium kultiviert. Die Phoenix-Zellen haben eine optimale Dichte zur Transfektion bei 70-80% Konfluenz. Das Passagieren der Zellen erfolgte bei Erreichen von 80-90% Konfluenz. Dazu wurde das Medium verworfen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1ml Trypsin für 2-5 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde die enzymatische Aktivität des Trypsins durch Zugabe von Medium abgestoppt, die Zellen wurden von der Platte gespült und auf neue Platten verteilt.

2.2.2.5 Feeder-Zell-Kultur

Feeder-Zellen werden durch γ Bestrahlung von NIH-3T3 Zellen hergestellt. Dazu werden NIH-3T3 Zellen kultiviert und passagiert, wie für Phoenix-Zellen beschrieben, bis sie 50-80% Konfluenz aufweisen. Anschließend werden sie mit einer Strahlendosis

von 30Gy bestrahlt und weitere 24 Stunden kultiviert. Sie werden dann mit einer Dichte von 100.000 Zellen pro well (6 well Platte) ausplattiert. Alle 5-10 Tage erfolgte eine Passage der Lymphomzellen auf frische Feeder-Zellen.

2.2.2.6 Produktion ecotroper Viren durch Phoenix-Zellen

Zur Produktion ecotroper Viren wurde die Phoenix-Verpackungszelllinie verwandt. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, die stabil Gene für die viralen Proteine Gag, Pol (der Genabschnitt gag kodiert für Kapsidproteine, der Genabschnitt pol kodiert für die reverse Transkriptase des Retrovirus) und Env (ecotropes Hüllprotein) exprimiert. Durch Transfektion von geeigneten Plasmiden können somit Retroviren produziert werden, die Zellen mit ecotropen Rezeptor infizieren können. Nach Infektion der Zielzelle wird die virale RNA in DNA umgeschrieben und stabil ins Genom integriert. Hierzu wurden einen Tag vor der Transfektion 5×10^6 Phoenix-Zellen pro 10-cm Kulturschale ausplattiert und am nächsten Tag (ca. 80% Konfluenz) mithilfe der CaPO_4 -Methode transfiziert. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium der Zellen gewechselt und die Zellen über Nacht mit 5ml frischem Medium inkubiert. Der Virusüberstand konnte am nächsten Tag geerntet und zur Infektion verwandt werden. Insgesamt wurde jeweils 4 Mal im Abstand von 12 Stunden Medium gesammelt und übertragen.

2.2.2.7 Phoenix-Zell Transfektion - Kalzium-Chlorid-Präzipitation

Wird Kalzium mit einer Phosphatlösung vermischt, fällt es in Form mikroskopisch sichtbarer Kristalle aus. Durch Zugabe von DNA zur Kalziumlösung präzipitiert diese auf Grund ihrer Phosphatgruppen ebenfalls und kann durch Phagozytose in Zellen aufgenommen werden. Die Lösung zur Kalzium-Phosphat-Transfektion wurde nach folgendem Schema hergestellt:

Tabelle 2.15 Pipettierschema zur Kalzium-Chlorid-Transfektion

Reagenz	Menge/Volumen
Plasmid DNA	20µg
Helper Plasmid DNA	15µg
CaCl 2M	62,5µl
H ₂ O	ad 500µl

In den jeweiligen Ansatz wurde tropfenweise 500µl HBS-Lösung pipettiert, wobei gleichzeitig eine intensive Durchmischung des Ansatzes durch Zufuhr von Luftblasen mittels einer Pasteurpipette durchgeführt wurde. Vor der Transfektion erhielten die Phoenix-Zellen 10 ml frisches Medium und 25µM Chloroquin (2,5µl eine 100mM Stock). Das Gemisch wurde unverzüglich auf die Zellen gegeben. Nach 12h erfolgte der erste Mediumwechsel (s.o.).

2.2.2.8 Lymphomzell-Infektion

12h vor Beginn der Infektion wurde das DMEM-Medium der Phoenix-Zellen durch 5 ml B-Zell-Medium ersetzt. Am ersten Tag der Infektion wurde morgens der virushaltige Überstand der Phoenix-Zellen mit einer Spritze abgenommen und filtriert (0,45 µm Filter) und anschließend 1µl Polybren (4mg/ml in PBS) pro 1ml Medium hinzugefügt. Dieses polymere quartäre Ammoniumsalz wurde verwendet, um die Membranpolarität der Zielzellen zu neutralisieren und so die Bindung der viralen Glycoproteine an ihre Rezeptoren zu verbessern. Dieser Vorgang wurde im Abstand von 12h drei Mal wiederholt, wobei nach der 2. und 4. Infektion das Medium der Zielzellen komplett ausgetauscht wurde.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 DNA-Extraktion

Die Lymphomzellen wurden pelletiert (5 min bei 1200rpm) und anschließend in 100µl DNA-Lyse-Puffer und 50µl Proteinase K resuspendiert. Nach einer Stunde Inkubation bei 55°C wurde die DNA mit 100µl Isopropanol präzipitiert und in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Anschließend wurde die DNA in 1ml Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem sprechenden Volumen H₂O resuspendiert.

2.2.3.2 Genotypisierungs-PCR

Zur Genotypisierung von p53-defizienten Lymphomzellen und p53^{ERTam}-Lymphomzellen mittels PCR wurden bereits etablierte Protokolle des Labors benutzt.

Tabelle 2.16 Übersicht über die verwendeten PCR-Ansätze

p53 LOH		p53^{ERTam}	
Reagenzien	Volumen (52,2µl)	Reagenzien	Volumen (18,5µl)
10 x PCR Buffer (mit MgCl ₂)	5µl	10 x PCR Buffer	2µl
dNTP (10µM)	0,6µl	MgCl ₂ (25mM)	1,5µl
X7 (10µM)	2µl	dNTP (10µM)	0,5µl
X6,5 (10µM)	0,35µl	Primer (10µM)	1µl (von jedem)
Neo (10µM)	2µl	Taq-Polymerase	0,3µl
Taq-Polymerase	0,25µl	H ₂ O	11,2µl
H ₂ O	41µl	DNA	2µl
DNA	1µl		

Tabelle 2.17 Übersicht über die verwendeten PCR-Programme

Reaktionsschritt	p53 LOH		p53^{ERTam}	
Initiale Denaturierung	94°C	5min	94°C	2min
Zyklen	32		34	
Denaturierung	94°C	30sec	92°C	70sec
Annealing	63°C	1min	66°C	70sec
Elongation	72°C	1min	72°C	2min
Terminale Elongation	72°C	5min	72°C	10min

2.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Analytische Agarosegele wurden hauptsächlich verwendet, um PCR-Produkte oder Restriktionen zu überprüfen. Die Konzentration der Agarose im Gel richtete sich nach den erwartenden Fragmenten und liegt im Allgemeinen zwischen 1-2%. Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht, 0,3µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und in einen Gelträger mit Gelkamm gegossen. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde der Gelkamm entfernt und die mit 6x Ladepuffer versetzten DNA-Proben in die Geltaschen pipettiert. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgröße wurde die erste Tasche jeweils mit 8 µl des pBr328 DNA Markers beladen bzw. ein 1kb-Marker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 0,5-1h bei 110V. Zur Dokumentation wurde die DNA unter UV-Licht bei 254nm sichtbar gemacht und das Gel mit einer Sofortbildkamera fotografiert.

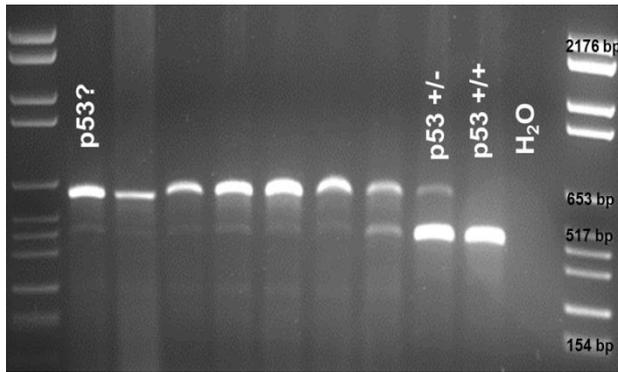


Abbildung 2.4 p53-LOH Genotypisierungs-PCR, Reihe 1-7 Lymphome mit fraglichem p53 Status, Reihe 8 p53 +/-, Reihe 9 p53wt, Reihe 10 H₂O. Reihe 1-6 wurde als p53null gewertet.

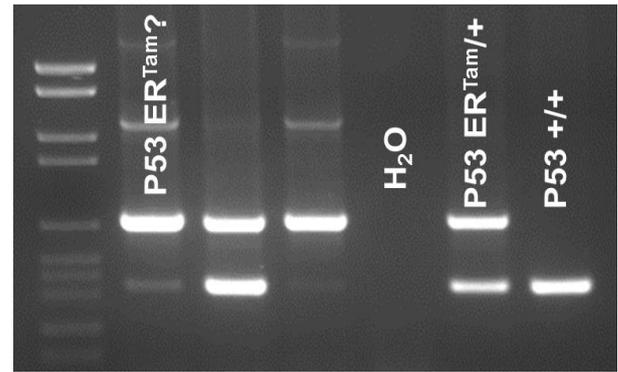


Abbildung 2.5 p53^{ERTam} Genotypisierungs-PCR, Lane 1-3 p53^{ERTam} Lymphome mit fraglichem p53^{ERTam} Status, Reihe 4 H₂O, Reihe 5 +/-, Reihe 6 wt.

Für weitere Experimente wurden nur Lymphome verwendet, die dem gewünschten p53-defizienten bzw. p53^{ERTam/-} Genotyp entsprachen.

2.2.3.4 RNA-Extraktion

Um RNase-Kontamination zu vermeiden, wurden für das Arbeiten mit RNA immer frische Einmalhandschuhe und gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Für die RNA-Isolation wurden Zellen mit 1ml Trizol LS Reagenz lysiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Proben wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C bis zu 2 Monate kryokonserviert. Die RNA wurde analog dem Invitrogen TRizol® Reagent Protokoll isoliert. Zur Weiterverarbeitung nach Trizolinkubation wurden 200µl Chloroform zugegeben und intensiv gemischt. Nach 3 minütiger Inkubation wurde der Ansatz bei 12.000 x g 15min bei 4°C zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde, ohne die Interphase zu berühren in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500µl Isopropanol 10min bei Raumtemperatur präzipitiert. Nach Zentrifugation des Ansatzes (10min, 12.000 x g, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das entstandene RNA-Pellet mit 1ml 75%igem Ethanol (verdünnt in DEPC-H₂O) gewaschen. Diethylpyrocarbonat (DEPC) modifiziert Histidinreste in Proteinen zu N-Carbethoxyhistidin und führt dadurch u.a. zur Hemmung von Enzymen. Insbesondere die Hemmung von RNasen ist von Bedeutung. DEPC reagiert allerdings auch mit Adenosin in einzelsträngigen Nukleinsäuren und Purinen in DNA. Zur Behandlung von Wasser mit DEPC, gibt man 1 ml DEPC in 1 Liter bidestilliertem Wasser (0,1% DEPC v/v) und rührt über Nacht. Durch Autoklavieren bei 20 psi für 20 Minuten wird DEPC

inaktiviert. DEPC reagiert dabei mit Wasser unter Hydrolyse zu Ethanol und CO₂. Nach Abzentrifugieren (7.500 x g, 4°C) des Ethanols wurde das Pellet luftgetrocknet und abschließend in 20µl DEPC-H₂O gelöst. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.3.5 cDNA-Synthese

Die cDNA wurde mit der SuperScript II Reversen Transkriptase von Invitrogen entsprechend dem zugehörigen Protokoll synthetisiert. Es wurde 500-1000ng RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt. Für die selektive Transkription der mRNA wurden Oligo-dT-Oligonucleotide verwendet. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C. Die cDNA wurde im 20µl Ansatz folgendermaßen synthetisiert:

Tabelle 2.18 Reaktionsschritte der cDNA-Synthese

Reagenzien	Volumen (20µl)
Oligo(dT) (500µg/ml)	1µl
RNA	500ng, x µl
dNTP-Mix (10µM)	1µl
H ₂ O	ad 12µl
Erhitzen auf 65°C für 5 min, auf Eis kühlen, hinzugeben von:	
5x First-Strand-Buffer	4µl
0,1M DTT	2µl
RNaseout (40Units/µl)	1µl
2min bei 42°C inkubieren, hinzugeben von:	
SuperScript™ II RT	1µl (200 Units)
50min bei 42°C inkubieren, anschließend 15min bei 70° inaktivieren	

2.2.3.6 Relative-quantitative-PCR (TaqMan® Assay)

Die quantitative qPCR bedient sich neben dem generellen Prinzip der qPCR der zusätzlichen Möglichkeit, ein Gen nicht nur auf RNA-Ebene nachzuweisen, sondern auch seine Expression zu quantifizieren. Dies gelingt durch eine an den Enden fluoreszenzmarkierte Sonde (Reporter am 5'-Ende, i.d.R. FAM und Quencher am 3'-Ende, TAMRA, bzw. nicht fluoreszierender Quencher), die sich zwischen den Primern an die cDNA anlagert. Während der Amplifikation durch die Polymerase wird die Sonde abgebaut, wobei durch es durch die Entfernung der Sondenenden voneinander zu

einem Fluoreszenzsignal des Reporters kommt. Das Fluoreszenzsignal wird am Ende jeder Elongationsphase gemessen, wodurch die Stärke des entstehenden Signals proportional zur vorhandenen Menge eines Transkripts ist. Tab. 2.19 zeigt das jeweils verwendete Pipettierschema, Tab. 2.20 die PCR-Bedingungen. Stets wurden pro Sample Doppelwerte pipettiert. Als Referenzgen diente das housekeeping gene GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase).

Tabelle 2.19 qPCR-Ansatz für die Verwendung der Reagenzien von Applied Biosystems

Reagenzien	Volumen (10µl)
TaqMan [®] Mastermix	2,5µl
TaqMan [®] Sonde	0,5µl
H ₂ O	5µl
cDNA (50ng/µl)	2µl

Tabelle 2.20 qPCR-Bedingungen

95°C	20 Sekunden	Step1
95°C	1 Sekunde	Step1
60°C	10 Sekunden	Step2

Die Auswertung erfolgte mit Unterstützung der Applied Biosystems Software. Die relative Gen-Induktion wurde mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode bestimmt:

$$\text{relative Induktion} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$\text{mit } \Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{behandelte Probe}) - \Delta C_T(\text{Referenzprobe})$$

$$\text{und } \Delta C_T = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{GPADH})$$

C_T ... threshold cycle, PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz signifikant über den Hintergrund ansteigt
GAPDH...Housekeeping Gene, endogene Kontrolle

Liste der untersuchten Gene**p53-Zielgene**

14-3-3sigma	DR5	Notch1	Prl3/Ptp4a3
alpha(II)PH	Fas	Noxa	PTGF-beta/Gdf15
ASNS	FDXR	P21 CIP1	Puma
ATF3	Gadd45	p53	Rrb2/p53R2
Bax	GEF-H1	PAI-1/Serpine1	SAK/Plk4
BTG2	HZF	PERP	Sestrin/Sesn2
Ccn3	IGF-1 receptor	phlda3	Slug/Snai2
CDK1(Cdc2a)	Mdm2	PIDD	Survivin
Cspg2/Vcan/Versican	Mdr-1/Abcb1b	PIG3/nqo1	Thrombospondin1
Cyclin G1	Mmp2	Tigar	

Seneszenz-assoziierte-Gene

Abc7	Cxcr2/Il8rb	Igfbp6	NIMA/Nek7
ARF	Cxcr6	Igfbp7	PKCb/Prkcb1
Atg4	Cyclin A/Ccna1	Il6	Prdx4
Atg7	Cyclin D/Ccnd1	IL7-receptor	SA-b-Galactosidase
Bcl2	Cyclin E/Ccne1	Ki67	SGK3
Bcl6	Dcbld2	Kitl	Sirt1
biglycan	Decorin	klf4	Siva1
CD133/Prom1	Dhfr	Lrp1	Stat2
CD44	EGR1	Map1LC3	Stk4
Col1A1	Foxo3a	Maspin/Serpib5	Suv39h1
Ctgf	GM-CSF	MCP1/Ccl2	Tgfb1
Cxcl1	HNRNPA1	Mip3alpha/Ccl20	Thrombospondin2
cxcl5	ID1	Mmp3	VEGF-A
Cxcl14	ID2	NFKB2	VEGF-R1/Arhgef2
Cxcl16			

2.2.3.7 Klonierung der sh-Sonde gegen TSC2

Die Klonierung von DNA-Fragmenten beinhaltet neben der Amplifikation und Aufreinigung auch die Linearisierung des Vektors und die Generierung des zu klonierenden DNA-Fragments (*insert*) mit anschließender Ligation. Für die Umsetzung dieser einzelnen Schritte wurden verschiedene enzymatische Modifikationen angewandt. Die dabei verwendeten Enzyme sind in Tabelle 2.12 aufgelistet.

Die Klonierung der genspezifischen sh-RNA Sonde gegen TSC2 erfolgte mit dem pSuperRetro Plasmid System von OligoEngine analog den Angaben des Herstellers. Nach Anleitung des pSuper RNAi Systems von OligoEngine, einer Software zur Ermittlung mutmaßlich geeigneter short-hairpin-Sequenzen wurden 3 TSC2-

genspezifische Haarnadelstrukturen-codierende Sequenzen designed und hinter den H1-Polymerase III Promotor des pSuper Vektors kloniert (<http://www.oligoengine.com/products/pSUPER.html>). Im Anschluss wurden die Sonden auf die Effizienz des erfolgten knockdowns untersucht und die Folgeexperimente ausschließlich mit der Sonde durchgeführt, mit welcher der stärkste Knockdown erzielt wurde.

2.2.3.9 Isolierung von DNA aus Gelen

Zur Isolierung von DNA aus Gelen wurden die entsprechenden Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Elution von DNA aus einem präparativen Agarosegels erfolgte mit dem *Qiaquick Spin Gel Extraktion Kit* der Firma Qiagen anhand des beiliegenden Protokolls. Die extrahierte DNA wurde in 10-30µl EB-Puffer gelöst.

2.2.3.10 Restriktionsverdau

Enzymmenge, Zusammensetzung der Puffer und Reaktionsbedingungen des Restriktionsverdaus entsprachen den Angaben des Herstellers. Verwendet wurden dabei Restriktionsendonucleasen vom Typ II, die die DNA innerhalb ihrer spezifischen Erkennungssequenz palindromisch spalten. Dabei entstehen zueinander komplementäre 5'- bzw. 3'-überhängende, kohäsive Enden (sticky ends). Ausgangsmaterial für den Restriktionsverdau waren entweder Vektor-Plasmid-DNA, über PCR amplifizierte DNA-Fragmente oder DNA aus einer Mini- bzw. Maxipräparation.

Tabelle 2.21 Standardansatz zum Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Reagenzien	Volumen (20µl)
Enzym1	0,5µl (10 Units)
Enzym2	0,5µl (10 Units)
Puffer	2µl
H ₂ O	15µl
DNA	2µl

Der Ansatz wurde bei 37°C für 1-2h inkubiert und anschließend auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen. Bei einem präparativen Restriktionsverdau (gegebenenfalls für

eine anschließende Klonierung) wurden 5-10µg DNA eingesetzt und der Gesamtrestriktionsansatz auf 30-40µl erhöht.

Zur Klonierung der sh-RNA wurde die präparierte DNA (ca. 1 bis 3 µg) mit *EcoRI* und *HindIII* bei 37°C für 2h verdaut und die Restriktionsprodukte durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Im Falle eines positiven Klons, der die sh-RNA im pSuper Vektor enthielt, wurde ein 281 bp großes Fragment erwartet. Negative Klone, die keine sh-RNA in ihrer pSuper DNA enthielten, zeigten ein Fragment mit einer Größe von ca. 227 bp.

Verdau mit <i>EcoRI</i> & <i>HindIII</i>	
positiver Klon: Vektor mit Insert	281 bp
negativer Klon: kein Insert	ca. 227 bp

Plasmid-DNA, die die erwartete Bande aufwies, wurde in kompetente Zellen retransformiert, um anschließend durch Maxi- Präparation größere Mengen an Plasmid-DNA zu gewinnen.

2.2.3.11 Vektor-Insert-Ligation

Vektor und Insert wurden in einem Verhältnis von 1:5 mit 5U/µl T4 Ligase 2h bei Raumtemperatur oder bei 16°C über Nacht ligiert. Die Ligase wurde durch 10 min Inkubation bei 5°C inaktiviert. Zur Kontrolle wurde jeweils der Vektor ohne Insert ligiert.

Tabelle 2.22 Standardansatz zur Ligation

Reagenzien	Volumen (20µl)
Vektor DNA	1µl
Insert DNA	10µl
T4 Ligase (5 Units/µl)	1µl
Ligase Puffer	2µl
H ₂ O	ad 20µl

2.2.3.12 Transformation von *E. coli* mit Plasmiden

Zur Transformation von *E. coli* wurde ein Aliquot der bei -80 °C gelagerten kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Pro Transformation wurden 50µl der Bakterien mit 3µl der Plasmid-DNA vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein

Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42 °C, wodurch das Eindringen der Plasmid-DNA in die Zellen erleichtert wurde. Anschließend wurden die Bakterien weitere 2 Minuten auf Eis gekühlt. Die Bakterien wurden 1h bei 37°C in 500µl LB-Medium vorkultiviert, an der Flamme mit Hilfe eines Drigalskispatels auf LB-Agarplatten mit 100µg/ml Ampicillin ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert so dass am folgenden Tag Kolonien zur Gewinnung der Plasmid-DNA gepickt werden konnten. Die Platten wurden anschließend bei 4°C gelagert.

2.2.3.13 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen

Minipräparation

Für die Minipräparation wurden mehrere Klone von den am Tag zuvor transformierten *E.coli* mit sterilen Pipettenspitzen gepickt und in 2,5ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler mit 180 Umdrehungen pro Minute in Glasröhrchen inkubiert. 1,5ml dieser Kultur wurden in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und in einer Tischzentrifuge mit 6000 Umdrehungen pro Minute bei Raumtemperatur für 5 Minuten abzentrifugiert. Die restliche Bakterienkultur wurde bei 4°C gelagert, um damit gegebenenfalls LB Medium für eine Maxipräparation beimpfen zu können. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 100µl Mini-Prep-Lösung I durch Vortexen resuspendiert. Dann wurden 200µl Mini-Prep-Lösung II zupipettiert, durch 2-3 maliges Kippen vorsichtig gemischt und 3 Minuten, in keinem Fall länger als 5 Minuten, bei Raumtemperatur inkubiert. Zu dem Ansatz wurden 150µl Prep-Lösung III gegeben, durch Schütteln vermischt und bei 14000 Umdrehungen pro Minute und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1,5ml Reaktionsgefäße gegeben und das 0,7-fache Volumen Isopropanol (ca.280µl zur Fällung der DNA) zugefügt. Die gefällte DNA wurde mit 14000 Umdrehungen pro Minute für 15 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet einmal in 500µl 70 % Ethanol gewaschen. Dann wurde nochmals abzentrifugiert (14000 Umdrehungen pro Minute, 10 Minuten, 4°C), der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und in 50µl Wasser gelöst.

Maxipräparation

Für eine Maxipräparation von Plasmid-DNA wurde eine Kolonie der am Vortag transformierten *E.coli* mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 3 ml LB Medium

mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum für 6 Stunden bei 37 °C im Schüttelinkubator (180 Umdrehungen pro Minute) kultiviert. 200µl dieser Vorkultur wurden zum Beimpfen einer 200 ml Kultur in LB-Medium mit Selektionsantibiotikum verwendet und diese über Nacht bei 37°C und 180 Umdrehungen pro Minute kultiviert. Alternativ wurden 200µl der verbliebenen Kultur für die Minipräparation zum Beimpfen der Hauptkultur verwendet. Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus der über Nacht inkubierten Flüssigkultur wurden Maxi- (200ml) Präparationen angefertigt. Die Maxi-Präparationen wurden mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kit gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Der Aufschluss der Bakterien erfolgt hierbei durch alkalische Lyse, die Separation der Plasmid-DNA nach dem Prinzip der Anionenaustauscher-Chromatographie. Der gewonnene plasmid-haltige Überstand wurde mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol gefällt und das Präzipitat 30 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und schließlich in 100 - 300µl H₂O aufgenommen.

2.2.3.14 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Konzentration und Reinheitsgrad von Nukleinsäuren wurden UV-spektrometrisch bestimmt. Es wurde die Absorption der Nukleinsäure haltigen Lösung gegen die Absorption des Lösungsmittels H₂O bei 260nm (Absorptionsmaximum der Purin- und Pyrimidinbasen) gemessen. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wurde das Verhältnis aus den Absorptionen bei 260 nm und 280 nm (Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren) gebildet. Ein Verhältnis von 1,8 bis 1,9 entspricht einem hohen Reinheitsgrad der doppelsträngigen DNA

2.2.4 Seneszenz Assays

2.2.4.1 SA-β-Galactosidase Färbung

Seneszenz-assoziierte-beta-Galactosidase (SA-β-Gal) ist ein Enzym, welches die Hydrolyse von β-Galactosidasen in Monosaccharide katalysiert. Zur Detektion dieser Reaktion dient X-Gal, welches ein blaues Präzipitat bildet, nachdem es durch die Galactosidase geschnitten wurde. Die meisten Zellen exprimieren eine lysosomale β-Galactosidase, welche ihr Reaktionsoptimum bei pH 4,0 hat und welche in präseneszenten Zellen und seneszenten Zellen gleichermaßen aktiv ist. 1995 entdeckten Dimri et al., dass bei pH 6,0 ausschließlich seneszente Zellen anfärbbar

sind (17). Ein pH von 6,0 ist das Optimum für humane Zellen, murine Zellen zeigen ihr Optimum bei pH 5,5. Heute erklärt man sich dieses Phänomen durch eine spezifische Überexpression und Akkumulation der endogenen lysosomalen β -Galactosidase (127). Die Expression dieser β -Galactosidase ist nicht obligat für Seneszenz, stellt jedoch den am häufigsten eingesetzten Biomarker für seneszente Zellen dar. Zum Nachweis der SA- β -Galactosidase dient das Substrat X-Gal. X-Gal (auch BCIG für bromo-chloro-indolyl-Galactopyranosid) ist ein organisches Molekül, welches aus Galactose und einem Indol zusammengesetzt ist. Für den cytochemischen Nachweis der Seneszenz-assoziierten- β -Galactosidase-Aktivität wurden die Zellen mit SA- β -Gal-Fixierlösung für 10min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden sie zwei Mal mit PBS mit 1mM $MgCl_2$ (pH 5,5) gewaschen. Zum Nachweis der Enzymaktivität wurden die Zellen 8-14h in SA- β -Gal-Inkubationslösung bei 37° inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Spaltung von dem Substrat X-Gal zu β -D-Galactose und Indolyl-Derivat 5-Bromo-4-Chloro-3-Hydroxyindol durch das Enzym SA- β -Galactosidase. 5-Bromo-4-Chloro-3-Hydroxyindol wurde zum unlöslichen 5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo oxidiert, welches in der Blaufärbung der SA- β -Gal-positiven Zellen resultierte. Alle Schritte erfolgten in 15ml Falcon Tubes. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Mowiol Mounting Medium eingedeckelt.

2.2.4.2 Zell-Zyklus-Analyse mit BrdU/PI Färbung

Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein chemisches Analogon des Nucleosids Thymidin bzw. Desoxyuridin. BrdU kann von der Zelle aufgenommen werden und in phosphorylierter Form anstelle des Nucleotids Desoxythymidintriphosphat (dTTP) während der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA eingebaut werden. Spezifische Antikörper gegen BrdU können eingesetzt werden, um eine erfolgte DNA-Synthese immunhistochemisch nachzuweisen. Propidiumiodid (PI) ist, ähnlich wie Ethidiumbromid, ein fluoreszierender Nucleinsäureinterkalator und kann daher als Maß für den Gesamt-DNA-Gehalt einer Zelle herangezogen werden.

Die Zielzellen wurden für 2h mit 20 μ M Bromodeoxyuridin (BrdU) markiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 80% Ethanol fixiert und über Nacht bei 4°C und für die weitere Aufbewahrung bei -20°C gelagert. Für die Antikörperfärbung wurde der Ethanol haltige Überstand so weit möglich entfernt. Die Zellen wurden in 1ml 2N HCl/Tritonx-100 resuspendiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA zu denaturieren. Dann wurde die Lösung entfernt und die Zellen wurden in 1ml 0,1M

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ pH 8,5 resuspendiert um die Proben zu neutralisieren. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und dann mit einem Alexa-Fluor 488-konjugierten anti-BrdU-Antikörper in einer Verdünnung von 1:15 in Inkubationspuffer aus 0,5% Tween 20 und 1% BSA in PBS und 0,6mg/ml RNase A über Nacht gefärbt. Am nächsten Tag wurden der Überstand entfernt und die DNA der Zellen wurde durch Resuspendieren in PBS mit 5µg/ml PI angefärbt. Die Proben wurden gefiltert und im Dunkeln auf Eis aufbewahrt, bis sie im Durchflusszytometer untersucht werden konnten.

2.2.4.3 Wachstumsbeobachtung

Für die Erstellung von Wachstumskurven wurden 8×10^5 Lymphomzellen pro 6-well bzw. 1×10^4 pro 12-well Zellkulturplatten ausgesät. An den entsprechenden Tagen wurden nach der Färbung mit Trypanblau die ungefärbten, lebenden Zellen ausgezählt. Die relative Zellzahl wurde als Verhältnis der Zellzahl des jeweiligen Tages zu der am Tag 0 ausgesäten Zellzahl ausgedrückt.

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Protein-Extraktion

Alle Proteine der Zelle wurden unfraktioniert isoliert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 Minuten, 1200 rpm) pelletiert und anschließend einmal in PBS gewaschen. Die Westernblot pellets wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder bis zu 2 Monaten bei -20°C aufbewahrt. Für die Zellyse wurden die Zellpellets aufgetaut, und in einem entsprechenden Volumen (50-150µl) Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden die pellets 45-60 min auf Eis inkubiert. Der NP-40 Lysepuffer enthielt NP-40 als Detergenz, sowie die Protease-Inhibitoren DTT, Natriumvanadat, Leupeptin und Aprotinin. Das Lysat wurde für 20 min bei 4°C und Maximalgeschwindigkeit von Zellresten separiert und in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt.

Zur Denaturierung der Proteine wurde 5xLaemmli Puffer hinzugefügt und die Proben für 7 min bei 90°C gekocht. Nach Kühlung auf Eis und erneuter kurzer Zentrifugation wurden die Proben direkt für die Gelelektrophorese weiterverwendet.

2.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zelllysaten wurde Roti-Quant Bradford-Reagenz in einer Verdünnung von 1:5 mit Wasser verwendet. Es wurden

Polystyrene 1xKüvetten verwendet. Zunächst wurde zur Kalibrierung des Photometers eine Verdünnungsreihe mit BSA in Wasser hergestellt. Eine Standardkurve von 0, 1, 4, 6, 8 und 10µg/µl Protein wurde vermessen. Für die Standardreihe wurde neben dem entsprechenden Volumen Standardlösung immer 1µl Lysepuffer in die Küvette gegeben. Variationskoeffizienten von unter 10% wurden als präzise genug angesehen. Die Reaktionsansätze wurden durch vorsichtiges Schütteln gemischt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 595nm.

2.2.5.3 SDS-PAGE

Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung der isolierten Proteine nach ihrer Größe wurden die zu untersuchenden Proteine in einem für die Proteingröße geeigneten Trenngel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Gel-Kammer mit 1 x Laufpuffer durchgeführt. Die Gele bestanden aus einem niedrigprozentigen Sammelgel und einem entsprechenden Trenngel. Trenn- und Sammelgel wurden mit 30% Rotiphorese Gel-Polyacrylamid-Mix hergestellt.

Tabelle 2.23 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel im Westernblot

Komponente	Sammelgel (12%,15ml)	Komponente	Trenngel (3ml)
H ₂ O	4,9ml	H ₂ O	2,1ml
30% Acrylamidmix	6,0ml	30% Acrylamidmix	0,5ml
1,5M Tris pH 8,8	3,8ml	1,5M Tris pH 8,8	0,38ml
20% SDS	0,1ml	20%SDS	0,03ml
10% APS	0,15ml	10% APS	0,03ml
TEMED	0,006ml	TEMED	0,003ml

Für die Elektrophorese wurden jeweils 30µg Protein mit 5x Laemmli Probenpuffer in einem Gesamtvolumen von 20µl vermischt und 7min bei 90°C denaturiert. Die Taschen wurden mit einem standardisierter Marker (Page Ruler) und den Proben beladen wurden und in einem Glycin-haltigen Laufpuffer der Elektrophorese durchgeführt. Bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten, wurde eine Spannung von 80V angelegt. Danach wurde die Spannung auf 120V erhöht.

2.2.5.4 Immunoblots

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden durch Semi-Dry-Blotting auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Dazu wurde eine Westernblot-Kammer wie in Abb. 9 gezeigt aufgebaut. Die Membran wurde in Methanol aktiviert. Der Transfer wurde bei max. 20 V und $x + 20$ mA ($x = \text{cm}^2$ der zu blottenden Oberfläche) für 1h durchgeführt. Die erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Membran wurde durch Ponceau-S überprüft. Die Membran wurde in 1xTBS-T gewaschen, bis die Farbe komplett entfernt war.

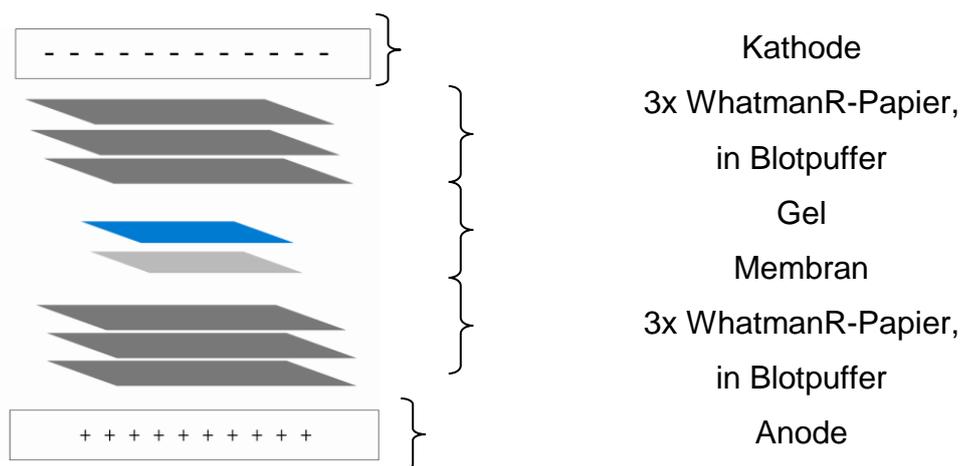


Abbildung 2.6 Aufbau eines Western Blots (Semi-dry, kontinuierlich)

2.2.5.5 Proteindetektion

Vor der Detektion des gewünschten Proteins erfolgt für 1 Stunde die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Blockpuffer bei RT. Nach dem Waschen der Membran in TBS-T (5 min) wurde sie mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert. Dann wurde die Membran mindestens für 3x5 min in ausreichend Waschpuffer gewaschen, für eine weitere Stunde schüttelnd bei RT mit dem passenden Sekundärantikörper inkubiert und anschließend erneut für 3x5 min gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte nach dem Prinzip der Chemilumineszenz. Für die Detektion wurde SuperSignal West Pico Substrat von Thermo Scientific verwendet. Die Chemilumineszenz wurde mit dem Detektor LAS-4000 von Fujifilm gemessen.

2.2.5.6 Strippen der Membranen

Um pro Membran die Expression mehrerer Antikörper zu untersuchen, wurde in einigen Fällen der gebundene Primärantikörper durch „Stripping“ von der Membran gelöst. Dazu wurde die Membran 3x5min in PBS gewaschen und anschließend für 2x10 min rotierend in Stripp-Puffer inkubiert. Danach wurde die Membran 3x5min in PBS gewaschen und konnte nach erneutem Blockieren für 1 h mit dem nächsten Primärantikörper inkubiert werden.

2.2.6 Mausbehandlung

Die Mausarbeit erfolgte analog den Vorgaben des Landesamts für Gesundheit und Soziales Berlin unter Einhaltung der vorgegebenen Standards. Individuelle Lymphome wurden durch Injektion von mindestens 1×10^6 Zellen in die Schwanzvene von nicht transgenen, immunkompetenten C57BL/6 Mäusen transplantiert und das Lymphom-Wachstum durch Abtasten der peripheren Lymphknoten im Abstand von jeweils drei Tagen kontinuierlich monitoriert. Zum Zeitpunkt einer palpablen Lymphomlast wurde mit der Behandlung begonnen. Die Mäuse wurden jeden zweiten Tag durch intraperitoneale Applikation von entweder Vehikel (10% PEG400, 10% Tween 80) oder Rapamycin 15mg/kg KG behandelt. Die Behandlung mit Cyclophosphamid 300 mg/kg KG (gelöst in PBS, intraperitoneale Applikation) erfolgte einmalig. Im Fall der Kombinationstherapie wurde ebenfalls einmalig mit CTX therapiert und in der Folge jeden zweiten Tag mit Rapamycin. Der Therapieeffekt bzw. ein mögliches Lymphom-Wachstum wurden, wie zuvor das Tumor-Onset, durch Palpation überwacht. Die Mäuse wurden entweder an Tag fünf nach Behandlungsbeginn zur Detektion von Seneszenz oder aber bei fortgeschrittener Erkrankung mittels CO₂ euthanasiert. Die Lymphome wurden präpariert und in Form von Zellsuspensionen oder kryokonserviert weiterverarbeitet.

2.2.7 Statistische Auswertung

In sämtlichen Diagrammen sind die Ergebnisse als Mittelwert, Fehlerbalken als Standardabweichung (SABW) dargestellt. Die statistische Auswertung der RTq-PCR erfolgte mithilfe des t-Tests, $p < 0,05$ wurde als signifikant angenommen. Verglichen wurden jeweils Unterschiede zwischen behandelten und nicht behandelten Lymphomen zum gleichen Zeitpunkt. Die Berechnung und graphische Darstellung in Form von heat

maps erfolgte freundlicherweise durch Frau Karin Zimmermann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulf Leser am Institut für Informatik der Humboldt-Universität zu Berlin.

Die Überlebenskurven wurden mit SPSS erstellt. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels Log-Rank Test.

Die graphische Darstellung aller anderen Diagramme wurde softwaregestützt mit GraphPad Prism v5 vorgenommen.

Die Fläche SA- β -Gal positiver Lymphknotenareale wurde mittels der Software ImageJ berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 TIS und OIS in primären Lymphomzellen.

p53-Zielgene in TIS und OIS wurden in primären Lymphomzellen unterschiedlichen genetischen Ursprungs untersucht. Bevor mit $myc;p53^{+/-}$ und $myc;p53^{+/ERTAM}$ -Lymphomen weitergearbeitet werden konnte, wurde eine Genotypisierungs-PCR durchgeführt (siehe 2.2.2.3). Nur Lymphome mit nachgewiesenem LOH wurden für weitere Experimente genutzt, da nur diese einem eindeutigen p53-defizientem oder p53-aktivierbarem Zustand entsprachen.

Diese Lymphome wurden als Passage LC0, das heißt direkt bei der ersten Kultivierung, mit dem anti-apoptotischen *bcl2* Gen retroviral infiziert. Die Infektion mit *bcl2* verhindert den apoptotischen Zelltod nach Behandlung mit zytotoxischen Chemikalien, bzw. nach Wiederaufnahme der p53-Funktion unter Behandlung mit Hydroxytamoxifen (4-OHT). Vielmehr wird nach dieser genetischen Veränderung durch DDR-Aktivierung prämaturre Seneszenz induziert. Die Abbildung 3.1 gibt einen Überblick über die genannten Lymphom-Modelle.

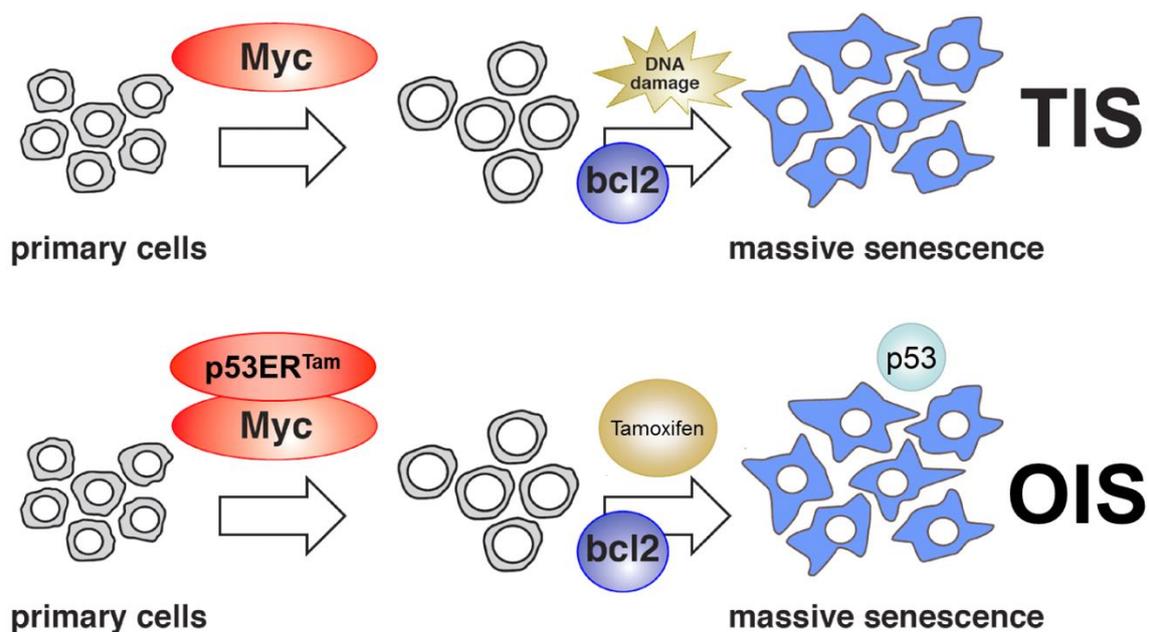


Abbildung 3.1 Induktion von TIS und OIS in Kontrolllymphomen bzw. p53-induzierbaren $p53^{ERTAM}$ -Lymphomen. TIS, Therapie-induzierte Seneszenz; OIS, Onkogen-induzierte Seneszenz

Die Induktion von TIS im myc-Lymphom-Modell ist seit Jahren etabliert (55). In Mäusen mit transplantierten myc;p53^{ERTAM/-}-Lymphomen lässt sich 6 Stunden nach Behandlung mit 4-OHT Apoptose nachweisen (123). Die Induktion von Seneszenz in myc/p53^{ERTam-}-Lymphomen im Kontext der bcl2-Überexpression im Sinne einer Onkogen induzierten Seneszenz (OIS) wurde erstmals durch unsere Arbeitsgruppe beschrieben (106).

3.1.1 Induktion von TIS in myc;p53^{+/-}, aber nicht in myc;p53null-Lymphomen

TIS wurde durch Behandlung mit dem Anthrazyklin Adriamycin (ADR) (a.k.a. Doxorubicin; 0,05 µg/ml) ausgelöst. Wie in Abb. 3.2 und 3.3 gezeigt, antworten bcl2-protectierte myc-Lymphome (Kontroll-Lymphome) auf diesen DNA-Schaden in *vitro* mit prämaturer zellulärer Seneszenz. Im Gegensatz dazu war in p53-defizienten, Apoptose-kompromittierten Lymphomen dieser Arrest nicht zu beobachten.

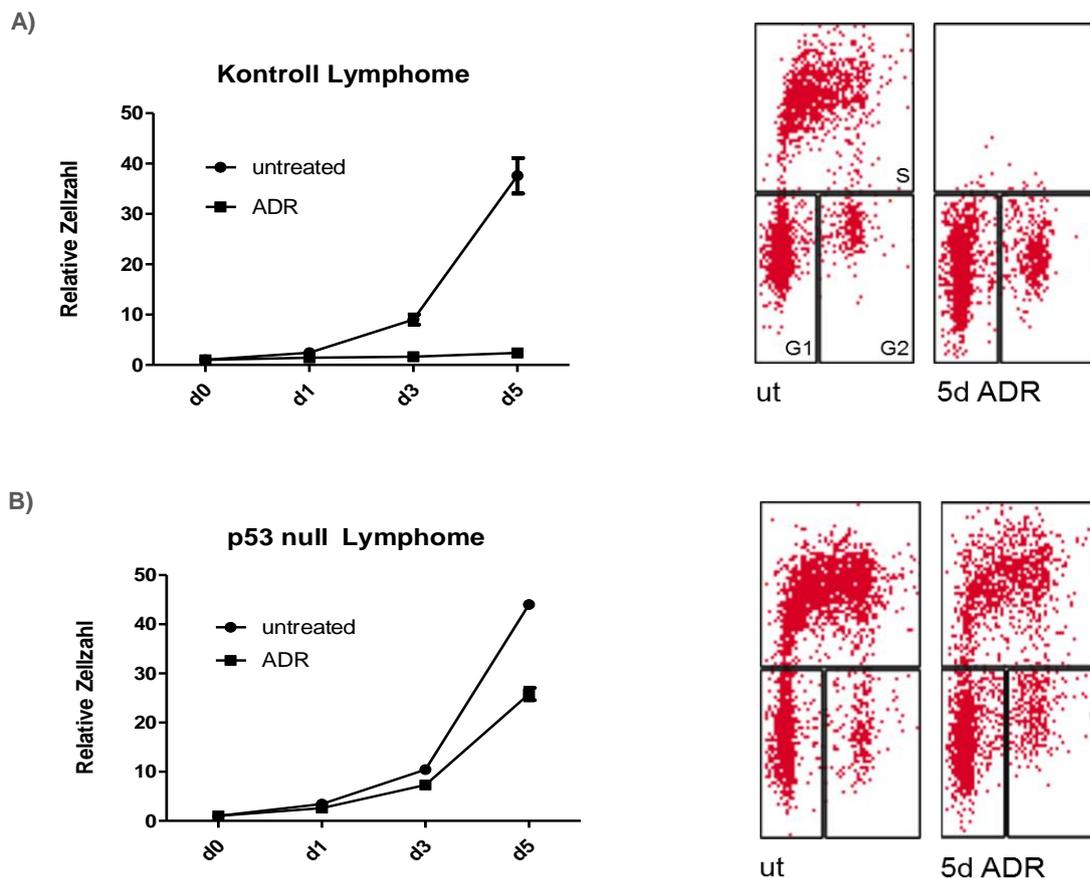


Abbildung 3.2 Wachstumsverhalten von A) Kontroll-Lymphomen und B) p53-defizienten Lymphomen nach Behandlung mit ADR. In Kontroll-Lymphomen führt die Behandlung mit ADR zu einem stabilen Wachstumsarrest, es befinden sich keine Zellen mehr in der S-Phase des Zellzyklus. Anders verhält es sich in p53-defizienten Lymphomzellen. Diese weisen einen Seneszenz-Defekt auf, wie hier mittels Wachstumsanalyse und Zellzyklusanalyse verdeutlicht. ut, unbehandelt; 5d ADR, 5 Tage ADR Behandlung.

Als weiterer Seneszenz-Nachweis diente die SA- β -Gal Färbung. Nur die p53-profizienten Lymphome wiesen eine positive Anfärbbarkeit für die SA- β -Galactosidase am fünften Tag der Behandlung auf. In den p53-defizienten Lymphomen blieb diese passend zur erhaltenen Proliferationskapazität aus.

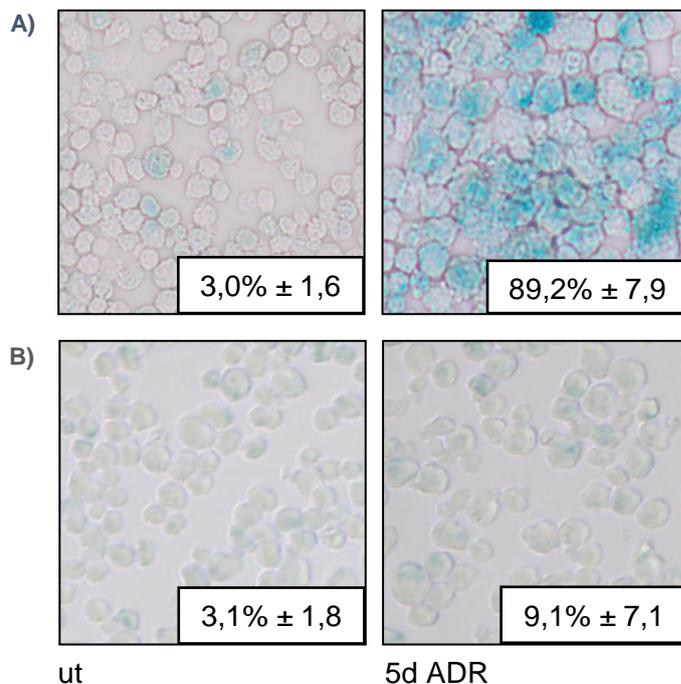


Abbildung 3.3 SA- β -Gal Aktivität in
 A) Kontroll-Lymphomen nach 5 Tagen
 Behandlung mit 0,05 μ g/ml ADR. Die
 Abbildung ist exemplarisch für 5 getestete
 Lymphome, Mittelwerte und SABW
 wurden aus eben diesen 5 Lymphomen
 gebildet. B) p53-defiziente Lymphome
 zeigen keine Positivität in der SA- β -Gal
 Färbung nach fünftägiger zytotoxischer
 Behandlung. Die Abbildung ist
 exemplarisch für 3 untersuchte
 Lymphome.

3.1.2 Induktion von Seneszenz nach Reaktivierung von p53 in *myc;p53^{ERTam/-}-bcl2* transduzierten Lymphomen

Zunächst konnte durch Beobachtung des Wachstumsverhaltens der Lymphomzellen in der Zellkultur bestätigt werden, dass die Aktivierung von p53 in *myc;p53^{ERTam/-}* Lymphomen durch Zusatz von Tamoxifen antiproliferativ wirkt. Anhand der Zellzahlbestimmung über mehrere Tage ließ sich der für den seneszenten Arrest typische Proliferationsstopp beobachten. Hingegen proliferierten Zell-Aliquots des jeweils selben Lymphoms unter der Behandlung mit Ethanol (EtOH), welches als Trägersubstanz für das Tamoxifen eingesetzt wird, mit gleicher Kinetik wie ihre unbehandelten Lymphomzell-Proben. Das Wachstumsverhalten von Tamoxifen behandelten Kontroll-Lymphomen (p53-profiziente, bcl-2-infizierte *myc*-Lymphome) entsprach dem von unbehandelten Kontroll-Lymphomen, siehe Abb. 3.4.

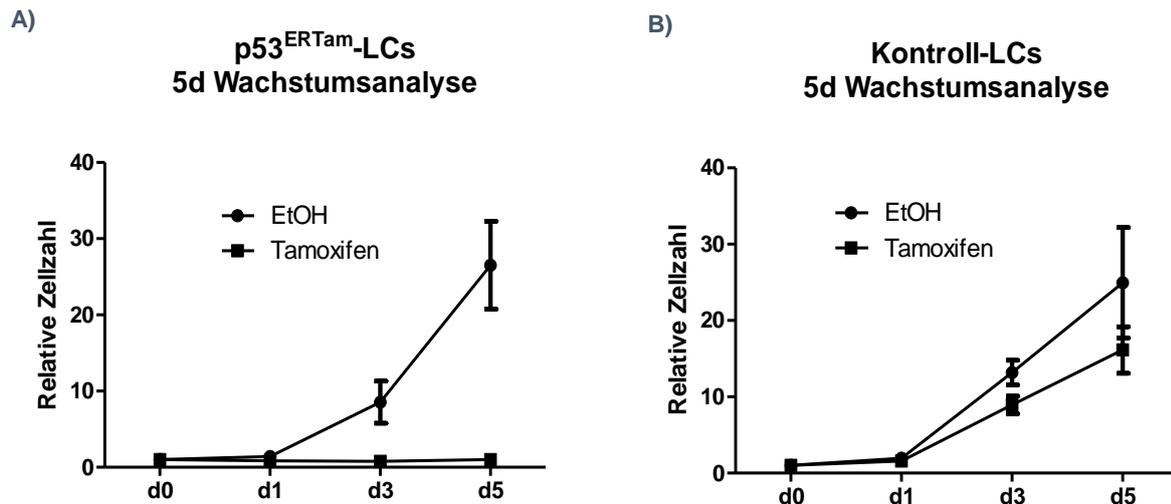


Abbildung 3.4 Wachstumsverhalten der p53^{ERTam}-Lymphomzellen nach Behandlung mit Tamoxifen. A) Tamoxifen behandelte p53^{ERTam}-Lymphomzellen wuchsen deutlich langsamer als Ethanol-behandelte p53^{ERTam}-Lymphomzellen. n=4 B) Tamoxifen behandelte Kontroll-Lymphome weisen ein Wachstumsverhalten ähnlich der EtOH Behandelten Kontrollen auf. n=5.

Nun stellte sich die Frage, ob der beobachtete Proliferationsstopp einem G1- oder einem G2-Arrest entsprach. Die Zellzyklusanalyse mittels BrdU/PI-Färbung ermöglicht eine genaue Aussage über DNA-Gehalt und die Zellzyklusphase einer Zelle bzw. Zellpopulation. Wie erwartet, konnte ein G1-Arrest in den mit 4-OHT behandelten Zellen beobachtet werden. Die Aktivierung von p53 führte in den myc-Lymphomen also zu einem irreversiblen Zellzyklusarrest, der prämaturnen Seneszenz, die im Kontext der konstanten myc-Aktivierung als onkogen induzierte Seneszenz betrachtet werden kann.

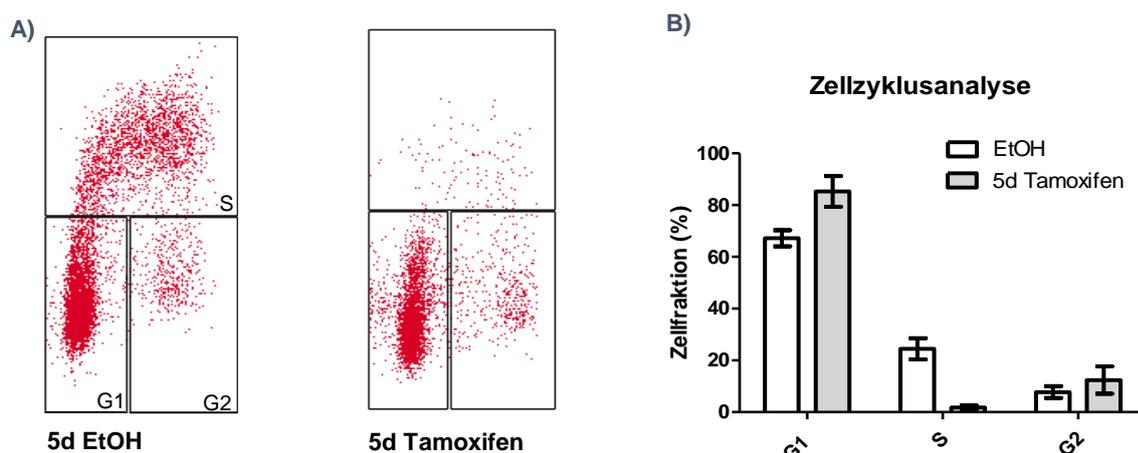


Abbildung 3.5 A) BrdU/PI-Färbung der mit EtOH oder 4-OHT behandelten p53^{ERTam}-Lymphomzellen. Der Anteil an BrdU-positiven Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase ist in den Dot-Plots dargestellt. Auf der Abszisse ist die die PI-Fluoreszenz, auf der Ordinate die Fluoreszenzintensität des Alexa-Fluor 488-konjugierten anti-BrdU-Antikörpers aufgetragen. Exemplarisch sind die Dot-Plots eines individuellen Lymphoms gezeigt. B) Darstellung der Anteiligen Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Messung von 3 individuellen Lymphomen.

Zusätzlich zu Wachstumsverhalten und Zellzyklusarrest wurden typische Seneszenz-Marker analysiert. An Tag fünf färbten sich die mit 4-OHT behandelten Zellen deutlich positiv in der zytochemischen Färbung für den klassischen Seneszenz-Marker SA- β -Galactosidase, wohingegen mit EtOH behandelte Zellen negativ für diesen Marker blieben (siehe Abb. 3.5). Als Kontrolle dienten *myc;p53^{+/+}*-Lymphome, die nach fünftägiger Behandlung mit Tamoxifen weder einen Wachstumsarrest, noch SA- β -Gal Positivität zeigten. Es wurden die gleichen Kontroll-Lymphome auf ihre Reaktion auf 4-OHT getestet, die wie in 3.1.1 beschrieben auf zytotoxische Behandlung mit einem seneszenten Wachstumsarrest reagiert haben.

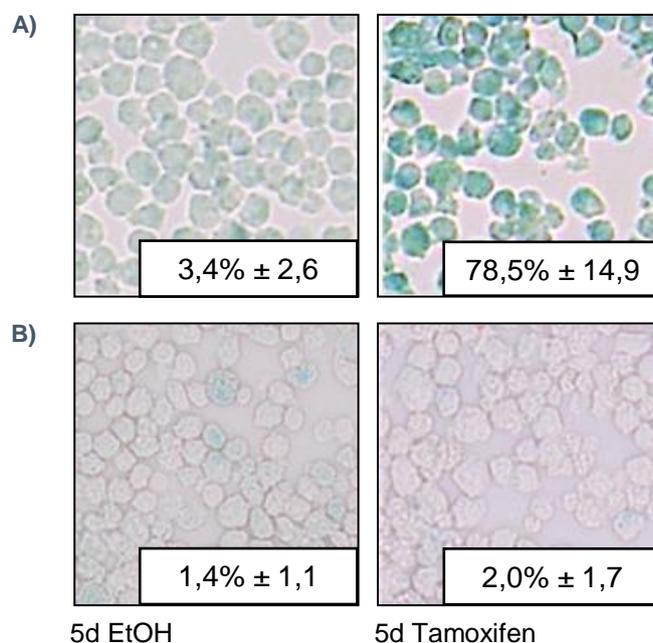


Abbildung 3.6 Tamoxifen induzierte Seneszenz A) Die fünftägige Behandlung mit 4-OHT induziert einen SA- β -Gal positiven Zellzyklusarrest in *myc;p53^{ERTam/-}-bcl-2* transduzierten Lymphomen. n=4 B) Kontroll-Lymphome werden durch Behandlung mit Tamoxifen nicht seneszent. Dargestellt sind jeweils repräsentative Lymphomzellen, unbehandelt und nach 5 Tagen Behandlung mit Tamoxifen. n=5

3.1.3 Die Aktivierung von p53 in *myc;p53^{ERTam/-}-bcl2* transduzierten Lymphomen führt zur Proteininduktion von p53-Zielgenen und Seneszenz-Markern.

Auch auf Proteinebene wurde die Aktivierung des induzierbaren p53, das durch Konformationsänderung durch Tamoxifen in den Nukleus transportiert werden kann, sowie seiner Zielgene überprüft. Zunächst wurde die Expression des p53-Östrogenrezeptor-Fusionsproteins dargestellt (bei 83kD), dass sich exklusiv in *myc;p53^{ERTam/-}*-Lymphomzellen nachweisen ließ.

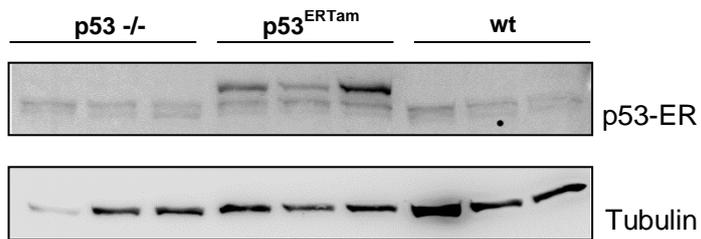


Abbildung 3.7 Dargestellt ist ein Immunoblot des an p53 gekoppelten Östrogenrezeptors (anti-ER-Antikörper). Nur in myc;p53^{ERTam}-Lymphomzellen ist der Östrogenrezeptor nachweisbar. Je Genotyp wurden 3 individuelle Lymphome untersucht.

Es erfolgte weiterhin die Analyse von Proteinlysaten nach Behandlung mit 4-OHT für vier Stunden, nach einem Tag und nach fünf Tagen, sowie als Kontrollbehandlung die Zugabe von Ethanol für fünf Tage. Nach Behandlung mit 4-OHT ließ sich eine sofortige Stabilisierung des p53-Proteins nachweisen. Obwohl die absolute Menge im Verlauf rückgängig, war auch nach fünf Tagen noch eine deutliche Zunahme des p53-Proteins nachweisbar. Die Expression des p53-Zielgens Puma stieg kontinuierlich an, je länger p53 aktiviert blieb. Des Weiteren konnten wir eine Akkumulation des Seneszenz-Markers H3k9me3 beobachten. Diese Effekte sind nicht nur auf die Aktivierung von p53 zurückzuführen, sondern im Zusammenhang mit der konstitutiven Expression des Onkogens myc zu verstehen, die durch die Überexpression des Apoptoseblockers bcl-2 zur Induktion von OIS führt.

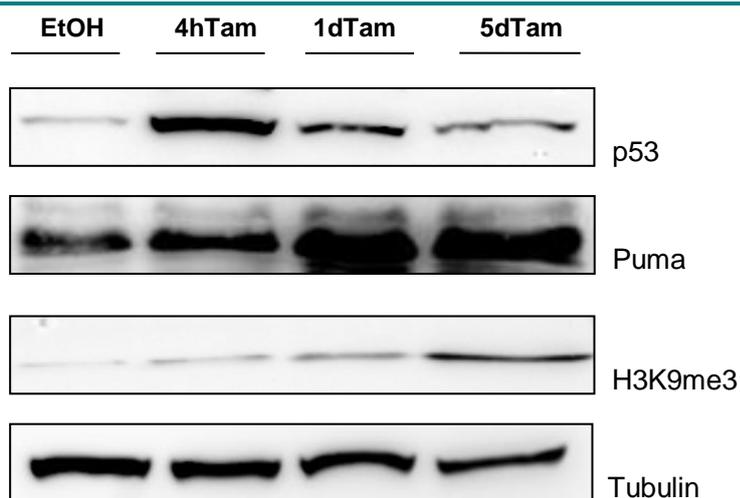


Abbildung 3.8 Immunoblot von myc;p53^{ERTam}-Lymphomzellen, die mit EtOH, 4h, 1d oder 5d Tamoxifen behandelt wurden. Das p53-Protein wird stabilisiert und induziert ein typisches p53-Zielgen: Puma. Nach 5d Behandlung steigt die Expression des Seneszenz-Markers H3K9me3. Es wird exemplarisch 1 individuelles Lymphom von 4 untersuchten Lymphomen dargestellt. Tam; Tamoxifen.

Das p53^{ERTam}-System ist folglich dazu geeignet, den p53-Status in myc-transgenen Lymphomzellen ligandenabhängig zu modifizieren. Dementsprechend kann das

p53^{ERTam}-System genutzt werden, um die Auswirkung des p53-Status auf die Induktion von p53-Zielgenen in prämaturer Seneszenz zu untersuchen.

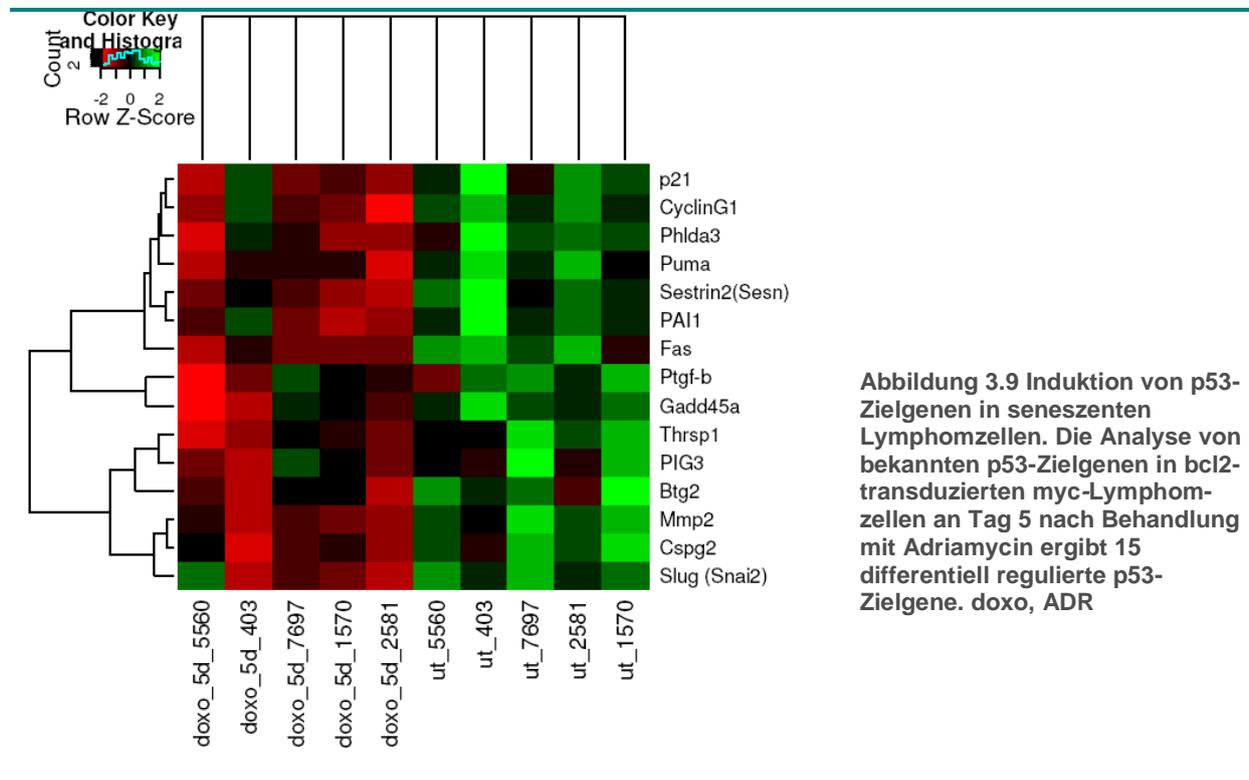
3.2 p53-induzierte Zielgene in zellulärer Seneszenz

3.2.1 Differentiell regulierte Gene in TIS in bcl2-transduzierten myc-Lymphomzellen

Basierend auf einer Literatur-Recherche wurden 39 p53-Zielgene definiert, die in die Untersuchung einbezogen werden sollten. Darüber hinaus wurde eine Liste von 57 weiteren Genen erstellt. Diese werden zum Teil bekanntermaßen in Seneszenz differentiell reguliert und tragen zum seneszenten Phänotyp bei (SASP), umfassen jedoch auch Gene, von denen ein Zusammenhang mit Seneszenz vermutet wird (von nun an: Seneszenz-assoziierte-Gene). Bei den Seneszenz-assoziierten Genen handelt es sich nicht um mutmaßliche p53-Zielgene. In der Literatur gibt es keinen Hinweis auf die Regulation dieser Gene durch p53. Dieses Vorgehen ermöglichte eine Untersuchung der bekannten p53-Zielgene und ihren Beitrag in Seneszenz sowie die Identifikation potentieller, in Seneszenz relevanter Gene, die möglicherweise als Konsequenz der Aktivierung p53-gesteuerter Signalkaskaden induziert werden. Eine vollständige Auflistung ist unter 2.2.3.6 zu finden.

Die Untersuchung dieser festgelegten Gensets erfolgte mittels quantitativer Echtzeit-PCR (RTq-PCR). Es wurden zunächst p53-Zielgene und Seneszenz-assoziierte Gene in Kontroll- (myc;p53^{+/+}) Lymphomzellen von fünf individuellen Lymphomen untersucht. Dafür wurden diese wie in 2.2.2.3 beschrieben für fünf Tage mit Adriamycin behandelt und anschließend die relative Genexpression bestimmt. Mit Hilfe eines t-Testes wurden anhand der ermittelten C_T-Werte die nach der Behandlung signifikant regulierten Gene ermittelt ($p < 0,05$). Im Folgenden werden zur besseren Übersicht heat maps immer getrennt für bekannte p53-Zielgene oder Seneszenz-assoziierte Gene gezeigt. Es werden nur die signifikant regulierten Gene dargestellt. Jede Zeile stellt ein untersuchtes Gen dar, jede Spalte repräsentiert ein Lymphom. Das Expressionsniveau jeder Probe wurde mittel Z-Transformation standardisiert. Dies dient dazu, einzelne Werte einer Stichprobe in Bezug auf ihre Lage in der Stichprobenverteilung zu charakterisieren. Dieser skalierte Ausdruckswert wird als Row Z-Score bezeichnet, und wird in einer rot-grünen Farbskala aufgetragen, bei der rote Werte eine hohe Expression und grüne Werte eine niedrige Expression anzeigen. Die z-Transformation

wird auch als Standardisierung oder Autoskalierung bezeichnet. Z-transformierte Werte werden vor allem dadurch vergleichbar, dass die Stichprobenwerte nach der Transformation nicht mehr in den Originalmaßeinheiten gemessen werden sondern in Vielfachen der Standardabweichung der Stichprobe.



Neben etablierten p53-Zielgenen wie p21, Puma und PAI-1 waren auch einige neuere, noch wenig charakterisierte Gene wie sestrin2 und phlda3 in TIS-seneszenten Lymphomzellen deutlich hochreguliert (Abb. 3.9). p21 wurde als p53 „downstream“ target ebenso wie PAI-1 als Seneszenz-relevant beschrieben (128). Unter den 19 differentiell regulierten Seneszenz-assoziierten Genen fanden sich erwartungsgemäß SASP Gene wie Il-6, MCP-1 und Mip3alpha (74), aber auch hier wurde die Expression einiger bisher in der Seneszenz weniger charakterisierter Gene wie die der extrazellulären-Matrix (ECM)-Faktoren CTGF, Col1A1 und Biglycan gezeigt (Abb. 3.10).

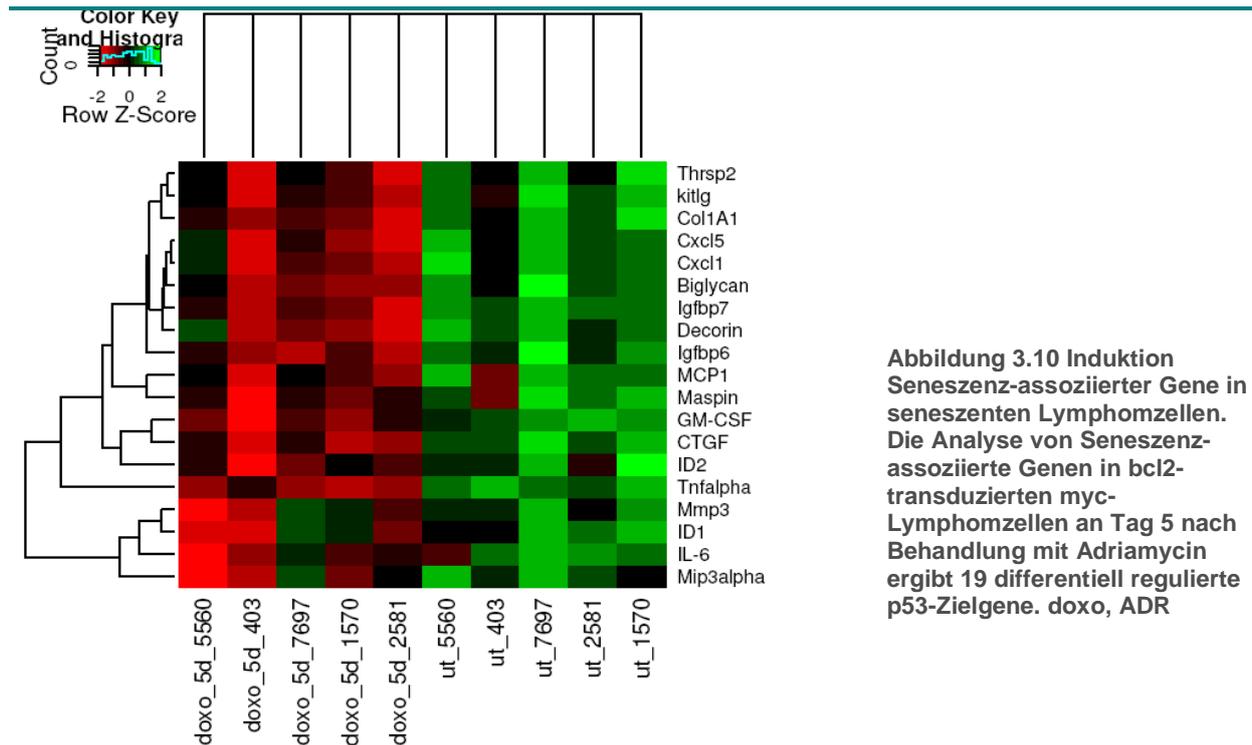
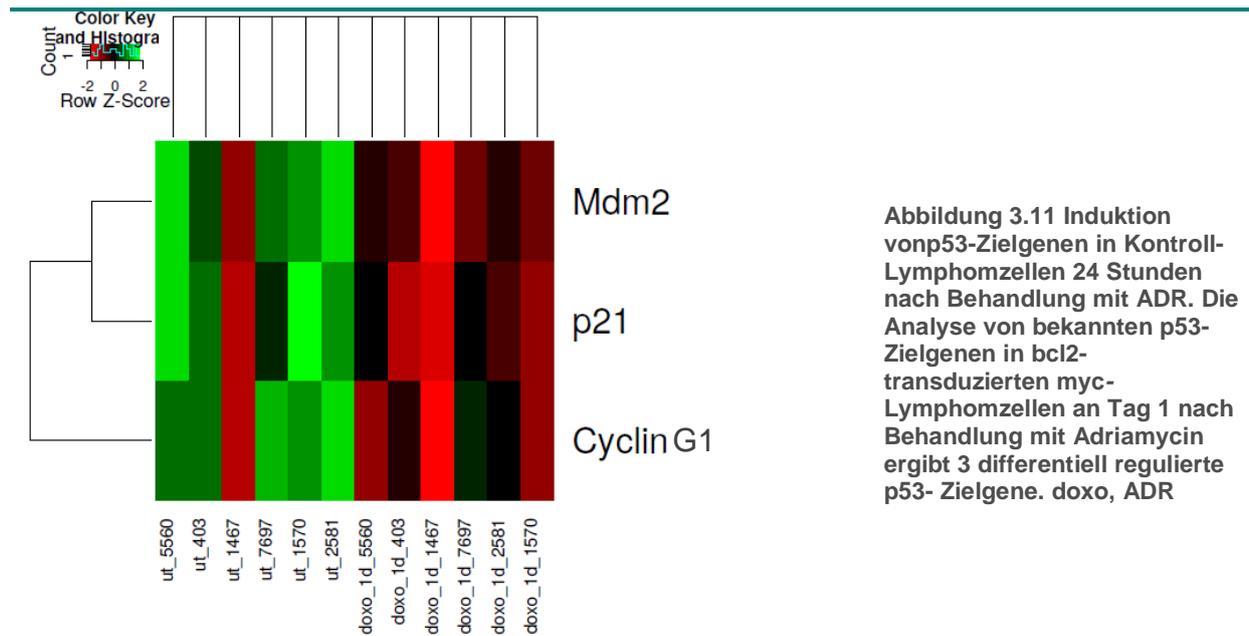


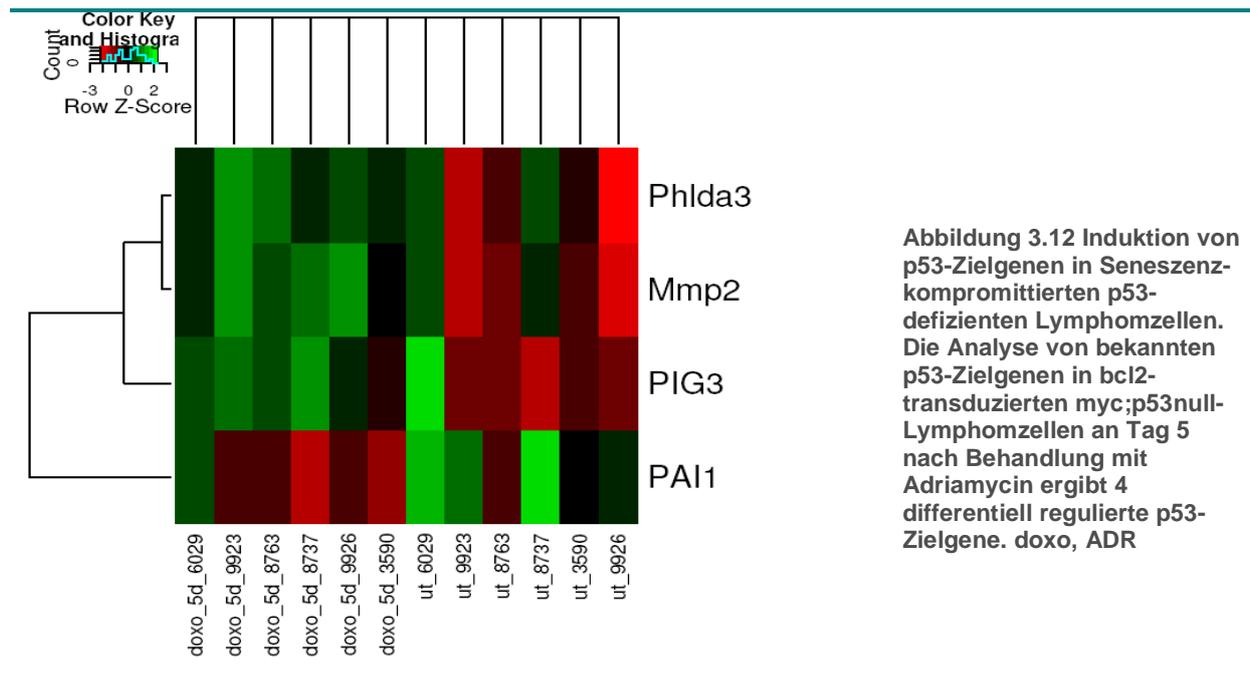
Abbildung 3.10 Induktion Seneszenz-assoziiierter Gene in seneszenten Lymphomzellen. Die Analyse von Seneszenz-assoziierte Genen in bcl2-transduzierten myc-Lymphomzellen an Tag 5 nach Behandlung mit Adriamycin ergibt 19 differenziell regulierte p53-Zielgene. doxo, ADR

Erwähnenswert ist dabei, dass die meisten dieser Transkripte erst nach 5 Tagen signifikant reguliert waren, also nicht als akute Antwort auf einen DNA-Schaden interpretiert werden können, sondern in diesem zeitlichen Kontext als spezifische Veränderungen im Rahmen der Induktion von Seneszenz gewertet werden müssen. An Tag 1 nach Beginn der Behandlung mit Doxorubicin konnte lediglich eine signifikante Regulation von Cyclin G1, p21 und Mdm2 beobachtet werden (Abb. 3.11). Cyclin G1 wird über die Interaktion mit Mdm2 eine Rolle in der Degradation von p53 zugeschrieben (129). Eine andere Arbeit beschreibt die Funktion von Cyclin G1 als positiven Feedback-Regulator von p53, welcher durch Mdm2 inhibiert wird und über den ARF-p53-Rb-Signalweg wachstumshemmende Effekte ausübt (130). Die Funktionen von p21 und Mdm2 wurden bereits unter 1.1.4 erläutert.

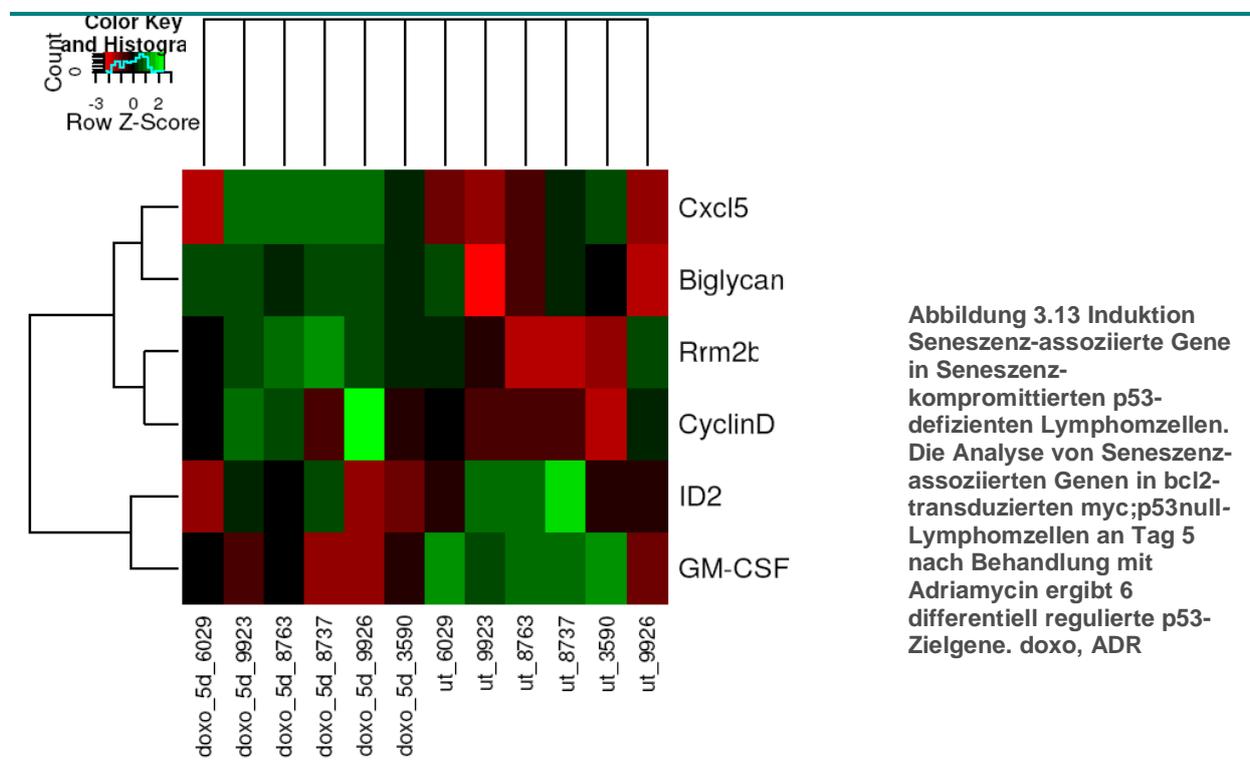


3.2.2 Differentiell regulierte Gene in myc;p53null-bcl2-transduzierten Lymphomzellen

Zur Kontrolle der p53-regulierten Expression dieser Gene dienten myc-transgene, p53-defiziente, bcl2-infizierte Lymphomzellen, die ebenfalls für fünf Tage mit Adriamycin behandelt wurden. Dabei wurden sechs individuelle Lymphome in die Analyse einbezogen. Wie erwartet, kam es trotz massivem DNA-Schaden in diesen Zellen kaum zu einer relevanten Regulation p53-abhängiger Gene (Abb. 3.12). Interessanterweise wurde auch in der Gruppe der Seneszenz-assoziierten Gene nur für zwei Gene eine moderate Hochregulation detektiert (Abb. 3.13). Dies lässt die starke Relevanz des p53-Signalweges in der Induktion von Seneszenz vermuten. Phlda3, Mmp2 und PIG3 wurden herunterreguliert und nur die Expression von PAI-1 wurde in diesen Zellen stimuliert.



Unter den Seneszenz-assoziierten Genen wurden nur ID2 und GM-CSF moderat hochreguliert, für Cxcl5, Biglycan, Rrm2t und CyclinD ließ sich nach Behandlung mit Adriamycin sogar eine verminderte Expression nachweisen (Abb. 3.13).



3.2.3 Differenziell regulierte Gene in $myc;p53^{ERTam/-}$ - $bcl2$ -transduzierten Lymphomzellen

Aus dieser Analyse ergab sich die Frage, ob die beobachteten Effekte auf die Genexpression durch die Aktivierung von p53 durch den gesetzten DNA-Schaden zu erklären ist oder ob auch andere Mechanismen, wie ein direkter Einfluss des Adriamycins oder die Aktivierung weiterer Signalkaskaden für die Expression der genannten Gene verantwortlich sind. Um diese Frage zu adressieren, wurde das induzierbare $p53^{ERTam}$ -Lymphom-Modell genutzt. Hiermit wird ein p53-verschaltetes Myc-Stresssignal vs. ein ADR-Stresssignal in bereits basal Myc-konstitutiven, p53-intakten Lymphomen untersucht. Analog der fünftägigen Behandlung mit Adriamycin wurden die myc -transgenen-, $bcl2$ -transduzierten-, $p53^{ERTam/-}$ -Lymphomzellen wie in 2.2.2.3 beschrieben mit 4-Hydroxytamoxifen behandelt. Dies löste einen seneszenten Arrest aus (siehe 3.1.3), wodurch sich das System optimal eignet um die Induktion von p53-Zielgenen in Seneszenz zu untersuchen. Die akute Induzierbarkeit des $p53^{ERTam}$ -Systems wurde durch Testung beider Gensets nach 4 Stunden Behandlung mit 4-OHT überprüft. Auch hier konnte die Funktionalität des aktivierbaren Transkriptionsfaktors p53 eindeutig bestätigt werden, da schon nach 4 Stunden zahlreiche seiner Zielgene transkriptionell aktiviert wurden. Im Gegensatz dazu werden die Seneszenz-assoziierten Gene nicht relevant reguliert (Abb. 3.14, man beachte die Skalierung). Dargestellt sind jeweils die neun am stärksten regulierten Gene beider Gruppen. Wie in Abb. 3.15 dargestellt, finden sich alle akut induzierten p53-Zielgene auch nach fünftägiger Behandlung mit Tamoxifen, und somit im seneszenten Arrest, signifikant reguliert.

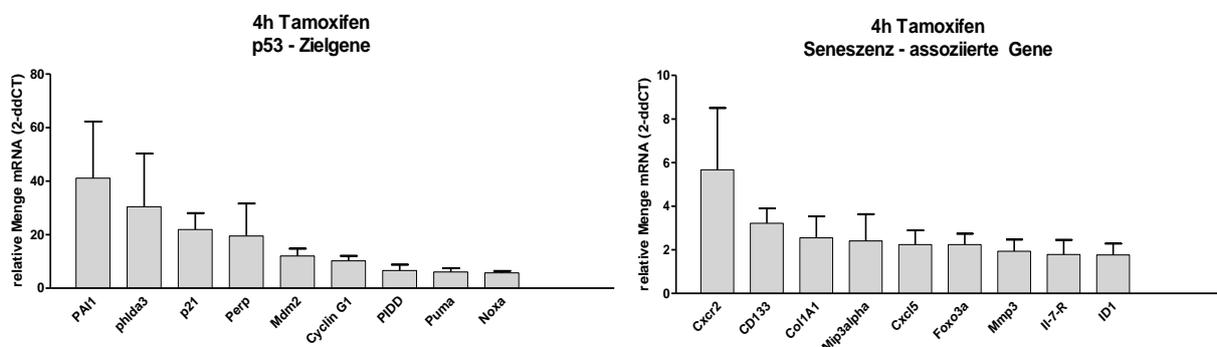
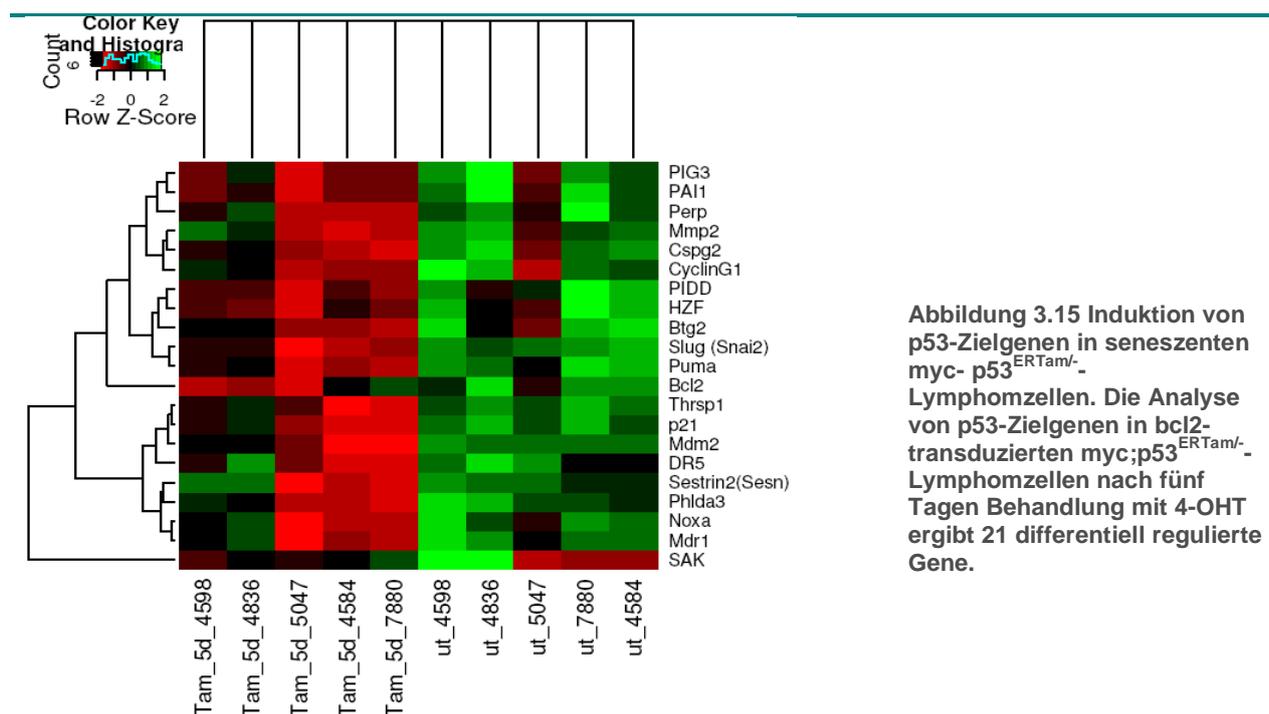


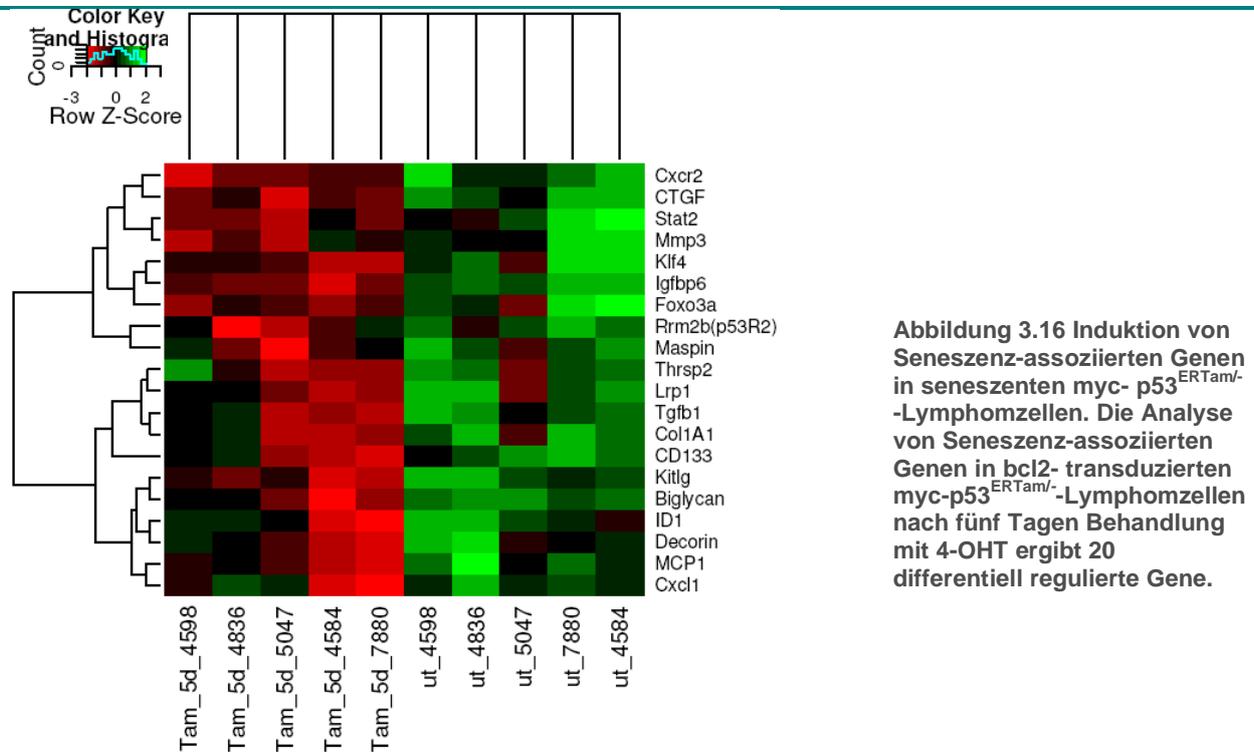
Abbildung 3.14 Relative Expression von p53-Zielgenen und Seneszenz-assoziierten Genen nach 4h Tamoxifen. myc - $p53^{ERTam/-}$ -Lymphomzellen wurden für 4h mit Hydroxytamoxifen behandelt um die akute Aktivierbarkeit des Transkriptionsfaktors p53 zu überprüfen. Die direkten p53-Zielgene werden deutlich stärker reguliert, als die Seneszenz-assoziierten Gene.

Nach fünftägiger Behandlung waren analog zu den Adriamycin behandelten Kontroll-Lymphomzellen typische p53-Zielgene wie PAI-1, phlda3, p21 und Puma hochreguliert (Abb. 3.15). Im Vergleich zu den mit Adriamycin behandelten Kontrollen (15 signifikante Zielgene) wurden jedoch 10 weitere Gene signifikant reguliert, die sich in den Kontroll-Lymphomen nach Behandlung mit Adriamycin nicht fanden: Bcl2, DR5, HZF, Mdm2, Mdr1, Noxa, Perp, PIDD und SAK. Dafür wurden jedoch Fas, Gadd45 und Ptgf- β (GDF15) nur in Kontroll-Lymphomen hochreguliert.



Die Analyse der Seneszenz-assoziierten Gene in p53-aktivierbaren Lymphomen ergab eine starke Expression der SASP Gene sowie von ECM-modelierenden Genen, ähnlich zu den TIS Lymphomen (Abb. 3.16). Fast alle Gene wurden positiv reguliert; es fand sich aber auch das herunterregulierte SAK. Die transkriptionelle Repression der polo-like-Kinase SAK durch p53 wurde bereits beschrieben, wobei die Repression von SAK zu der p53-vermittelten Induktion von Apoptose beitragen soll (131). Da sich neben den klassischen p53-Zielgenen in Lymphomzellen mit aktiviertem p53 auch nach fünf Tagen die Regulation weiterer, nicht direkt p53 regulierter Gene nachweisen ließ, kann spekuliert werden, dass diese entweder bisher nicht identifizierten p53-Zielgenen entsprechen oder aber, und das ist wahrscheinlicher, Ausdruck der Aktivierung weiterer Signalkaskaden im Kontext der akuten p53-Funktion sind.

Darunter fanden sich einige der zuvor in seneszenten Zellen gezeigten SASP Komponenten und ECM modulierenden Proteine. Hier kann spekuliert werden, ob diese Gene eventuell nicht nur Teil des seneszenten Phänotyps sind, sondern zur Induktion und auch Aufrechterhaltung von Seneszenz beitragen.



Tatsächlich bestand eine ausgeprägte Überschneidung der regulierten Gene in OIS und TIS. Es wurden 12 bekannte p53-Zielgene und 11 Seneszenz-assoziierte Gene in beiden Gruppen differenziell reguliert. Hier ließen sich 4 funktionelle Gruppen abgrenzen: Gene der Zellzyklusregulation, Apoptoseregulatoren, Zytokine/ECM-Faktoren und mTOR-regulatorische Gene. Bei den signifikant regulierten Genen ist auf Grund des experimentellen Aufbaus davon auszugehen, dass sie entweder durch p53 oder durch Aktivierung p53-abhängiger Signalwege eine entscheidende Rolle in der Induktion und Aufrechterhaltung von Seneszenz spielen. Das interessante Genset der Schnittmenge der differenziell regulierten Seneszenz-assoziierten Gene in myc;p53^{+/+}-Lymphomzellen und myc;p53^{ERTam/-}-Lymphomzellen wird in einem anderen Projekt der Arbeitsgruppe weiterverfolgt (siehe Abb. 3.17 B).

Bisher noch gar nicht im Zusammenhang mit Seneszenz untersucht ist die Funktion der Gene *sestrin2* und *phlda3*, die zwar als p53-Zielgene beschrieben wurden, deren biologische Funktion jedoch noch nicht vollständig verstanden ist. Sie sind daher für

weitere Analysen von besonderem Interesse, insbesondere, da beide inhibitorisch auf den mTOR-Signalweg einwirken.

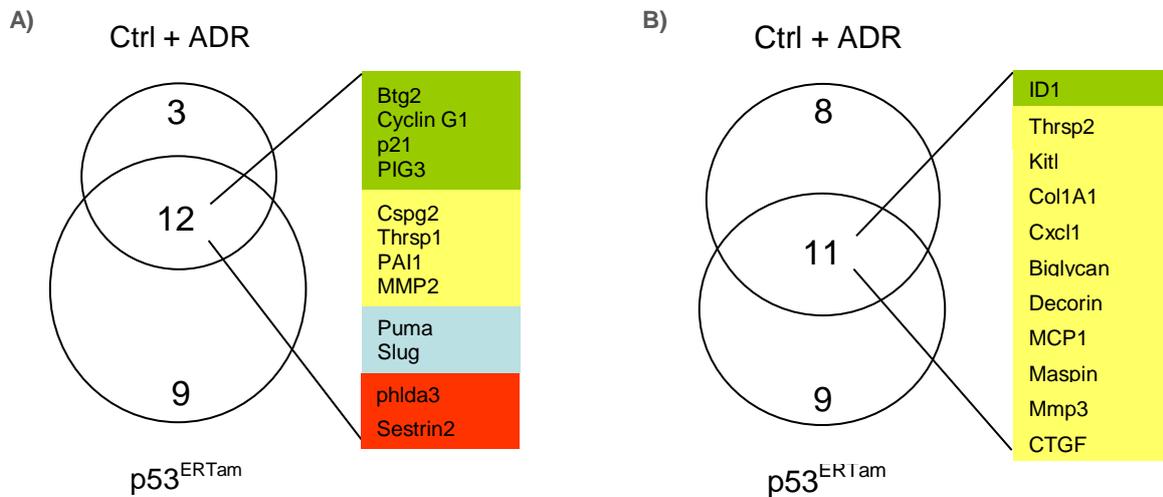


Abbildung 3.17 Überschneidung der differentiell regulierten Gene in myc;p53+/+ Lymphomzellen und myc;p53^{ERTam}- Lymphomzellen. A) p53-Zielgene. B) Seneszenz-assoziierte Gene. Die Überschneidungen sind für p53-Zielgene und Seneszenz-assoziierte Gene jeweils größer als deren individuelle Regulation. Grün: Zellzyklusregulatoren, Gelb: Zytokine/ECM, Blau: Apoptoseregulatoren, Rot: Suppressoren des mTOR-Signalwegs.

Um unspezifische Effekte des 4-OHT auszuschließen, wurden einige bekannte p53-Zielgene und SASP Komponenten nach fünftägiger Behandlung von Kontroll-Lymphomen mit 4-OHT untersucht. Wie in Abbildung 3.18 gezeigt, wurden die getesteten Gene zwar geringfügig reguliert, dies ist quantitativ aber nicht vergleichbar mit der Induktion durch Adriamycin in Kontrolllymphomen oder durch 4-OHT in p53^{ERTam}-Lymphomen.

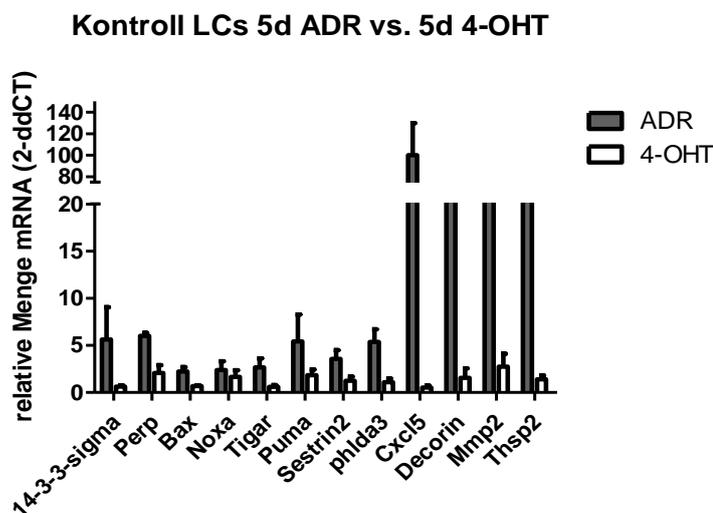


Abbildung 3.18 RTq-PCR von Kontroll-Lymphomen nach 5d Behandlung mit ADR oder Tamoxifen. Weder p53- Zielgene noch SASP-Komponenten werden nach Behandlung mit Hydroxytamoxifen relevant reguliert. Dies entspricht der negativen SA-β-Galactosidase-Färbung nach 5d 4-OHT.

3.2.4 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) in myc-transgenen TIS Lymphomzellen

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) ist ein Rechenverfahren, welches bestimmt, ob die Expressionslevel eines a priori definierter Satzes von Genen statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei biologischen Zuständen zeigt (z. B. Phänotypen). Man stellt sich die Frage, ob eine Gengruppe mit interessanten Genen angereichert (enriched) ist. Es wird die Verteilung der Genränge innerhalb der interessierenden Gengruppe G untersucht. Die Gengruppe ist angereichert, wenn viele Gene aus G hohe Ränge aufweisen, also in der geordneten Liste aller Gene eher "früh" auftreten.

Die Untersuchung der definierten Gengruppen erfolgte an Daten, die mittels Microarray (Affymetrix Chips) in Kontroll-Lymphomzellen nach fünftägiger Behandlung mit ADR in unserer Arbeitsgruppe erhoben wurden. Der Datensatz umfasst 21970 Gene. Es konnte gezeigt werden, dass eine unabhängig von uns erstellte Liste von p53-Zielgenen in seneszenten Lymphomzellen eine starke Anreicherung zeigt (p53 targets RILEY) (86), wodurch erneut die Relevanz von p53-Zielgenen in seneszenten Lymphomzellen deutlich wird. Des Weiteren zeigten sich sowohl das Genset „p53-Zielgene“ als auch das Set „p53-assoziierte Gene“ in der mit Adriamycin behandelten Gruppe im Gegensatz zur unbehandelten Gruppe angereichert (p value < 0,05). Die false discovery rate lag bei < 25%.

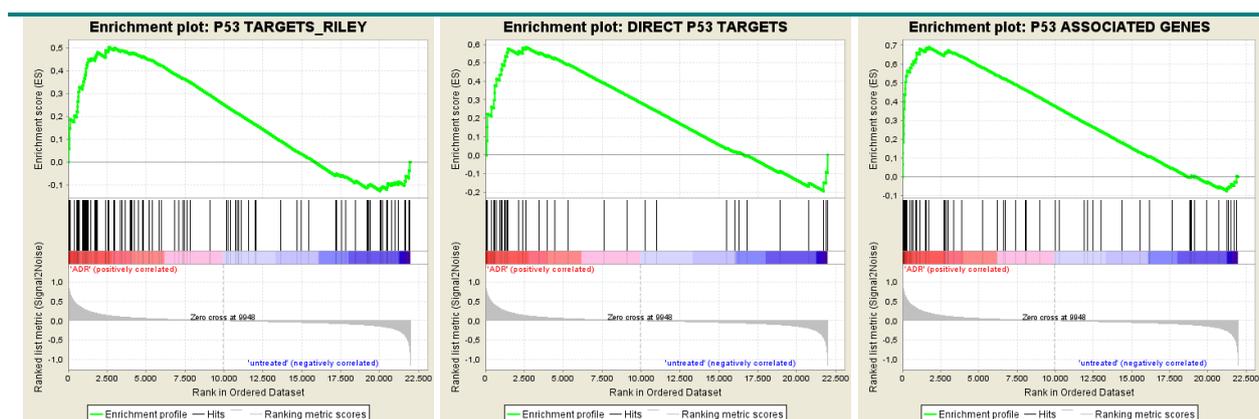


Abbildung 3.19 GSEA-Enrichment-Plots, Kontroll-Lymphome. Sowohl das Genset der p53-Zielgene, als auch die p53-assoziierten Gene reichern in der Gruppe der mit Adriamycin behandelten myc;p53+/+;bcl2 transduzierten Lymphomzellen an. p53 targets RILEY $p = 0,0$; direct p53 targets $p = 0,017$; p53 associated genes $p = 0,0$.

Führt man die Analyse an Suv39h1-defizienten und damit Seneszenz-kompromittierten Lymphomen (50) durch, so finden sich die von RILEY definierten p53-Zielgene, sowie

die Seneszenz-assoziierten Gene nicht signifikant angereichert (Abb. 3.20). Die von uns erstellte Liste der p53-Zielgene enthält viele Gene der DNA-Damage-Kaskade und des Apoptose-Signalwegs, so dass eine Induktion auch im Seneszenz-defizienten Setting durchaus plausibel ist.

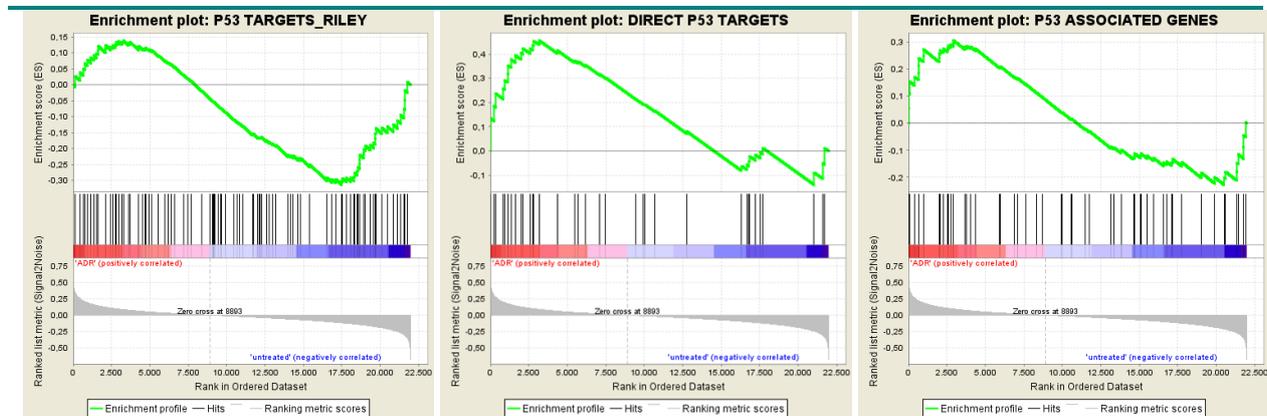
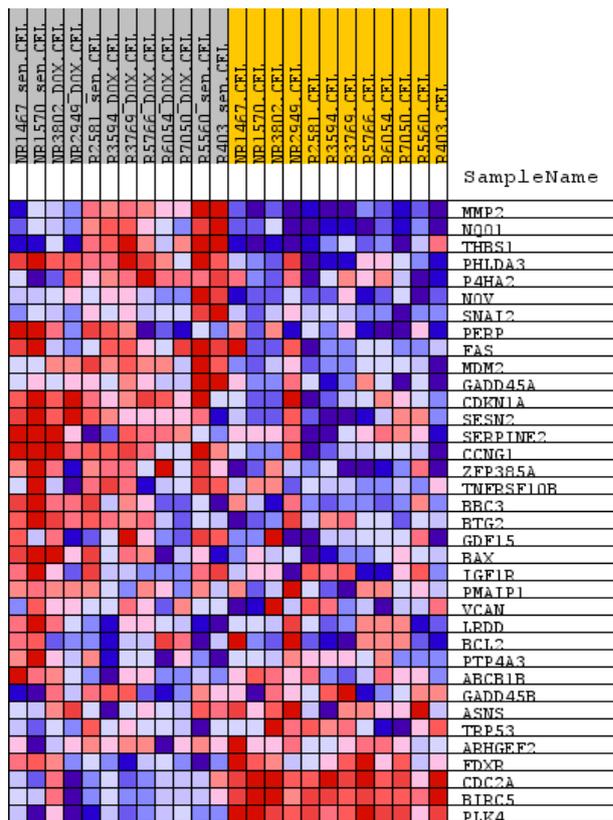


Abbildung 3.20 GSEA Enrichment Plots, Suv39h1-defiziente Lymphome. Sowohl das Genset der p53-Zielgene, als auch die p53-assoziierten Gene reichern in der Gruppe der mit Adriamycin behandelten myc;suv-;bcl2 transduzierten Lymphomzellen an. p53 targets RILEY $p = 0.226$; direct p53 targets $p = 0.0$; p53 associated genes $p = 0,106$.

Stellt man die getesteten Gene entsprechend ihrer Anreicherung in Form einer heat map dar (Abb. 3.21), so fällt auf, dass die zytoplasmatischen Gene *phlda3* und *sestrin2* in allen Lymphomen besonders stark und uniform exprimiert wurden. Dies ist insbesondere erwähnenswert, weil sich unter den Genen mit starker Expression – p53 getrieben oder nicht – hauptsächlich sekretierte Faktoren fanden. Lediglich *p21* (*CDKN1A*) wurde ähnlich konsistent in allen untersuchten Lymphomen reguliert.

A)



B)

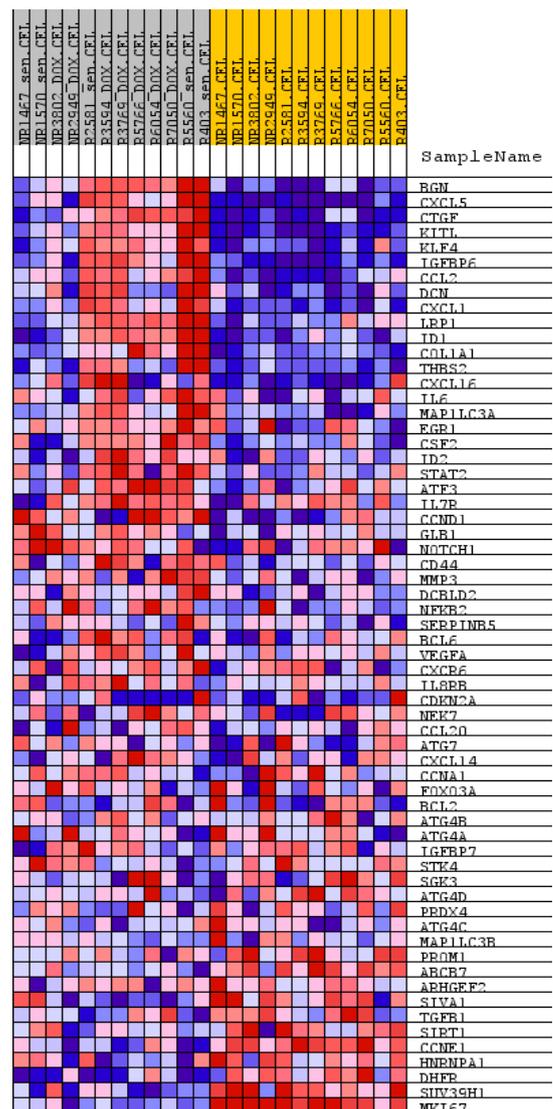


Abbildung 3.21 Gene Set Enrichment Analysen der seneszenten Lymphomzellen im Vergleich zu den unbehandelten Lymphomzellen. Die Reihenfolge der genannten Gene in der Heat-Map spiegelt von oben nach unten absteigend die „Ränge“ der stärksten Expressionsunterschiede ut vs. ADR wider. A) p53-Zielgene. Deutliche Expression der Gene sestrin2 und phlda3, die für zytoplasmatische Proteine kodieren, in allen untersuchten Proben. B) Seneszenz-assoziierte Gene.

3.3 p53-Zielgene inhibieren mTOR

3.3.1 Phlda3 und sestrin2 werden in seneszenten Lymphomzellen überexprimiert

Ein konsistentes Ergebnis der Genexpressionsanalysen war die Hochregulation der Gene phlda3 (pleckstrin homology [PH]-like domain, family A, member 3) und sestrin2. Dabei zeigte sich für beide Gene fünf Tage nach Behandlung mit Adriamycin eine

stärkere Expression als nach einem Tag. In $p53^{ERTam/-}$ -Lymphomen war nach Behandlung mit Tamoxifen eine noch stärkere Expression zu beobachten, was die p53-gesteuerte Transkription dieser beiden Gene unterstreicht. In p53-defizienten Lymphomen konnte, wie erwartet, keine relevante Expression von phlda3 und sestrin2 gemessen werden.

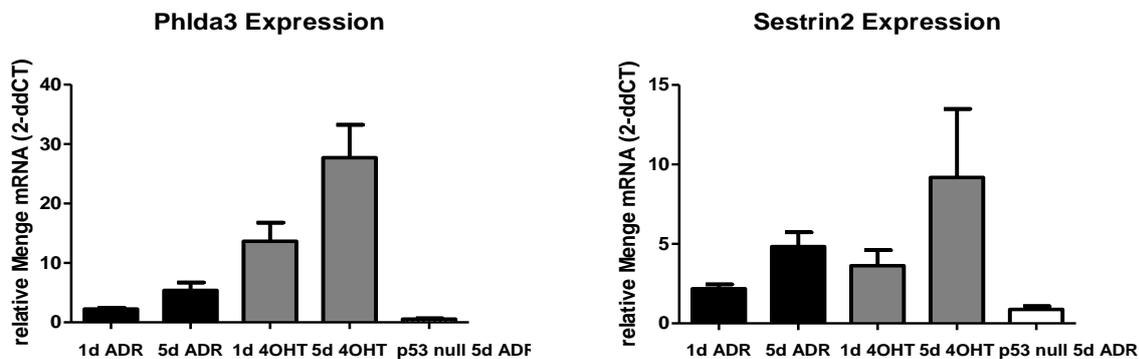


Abbildung 3.22 Phlda3 und sestrin2 wurden in TIS- und OIS-seneszenten Lymphomzellen verstärkt exprimiert. Die starke Hochregulation nach Aktivierung von p53 (durch 4-OHT) unterstreicht die Regulation durch den Tumorsuppressor. In p53-defizienten Lymphomen ist keine signifikante Regulation von phlda3 und sestrin2 zu verzeichnen.

Phlda3 wurde kürzlich als neues p53-Zielgen beschrieben, welches mit der PH-Domäne von AKT (auch Proteinkinase B) um Bindung an Membranlipide konkurriert und somit dessen Aktivierung hemmt (132). Sestrine (sestrin1 und 2), ebenfalls p53-Zielgene, inhibieren durch Phosphorylierung von Tsc2 via AMPK α (AMP-responsive Protein Kinase) den mTORC1 Komplex (133). Sestrin2 phosphoryliert AMPK α an Threonin 172, welches wiederum TSC2 aktiviert und folglich zu verminderter mTORC1 Aktivität führt. Auch die p53-Zielgene REDD1 und fbxw7 werden in seneszenten Lymphomzellen, also nach fünftägiger Behandlung mit ADR, verstärkt exprimiert (Abb. 3.23). Ihnen wird ebenfalls eine Inhibition von mTOR zugeschrieben. REDD1 übt seinen inhibierenden Effekt über Aktivierung des TSC1/2 Komplex aus, indem es das 14-3-3 Protein bindet und somit eine Dissoziation des TSC2/14-3-3 Komplexes mit konsekutiver Aktivierung von TSC1/2 bewirkt (134). Weiterhin agiert es über Rekrutierung des Serin-Threonin-Protein-2A (PP2A), welches AKT an T308 dephosphoryliert und damit inaktiviert (135). Fbxw7 reguliert die Ubiquitinierung, also den Abbau des mTOR-Proteins (136).

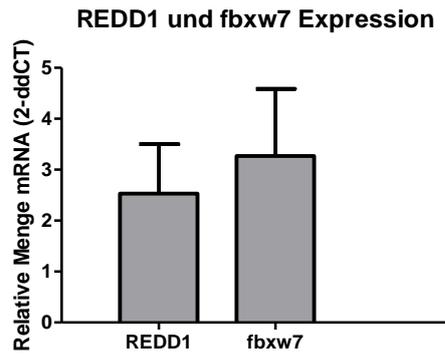


Abbildung 3.23 Die mRNA-Expression von REDD1 und fbw7 ist induziert in seneszenten Lymphomzellen. Untersucht wurden Kontrolllymphome nach fünf-tägiger Behandlung mit ADR. n=6

Ich postuliere also, dass die Aktivierung von p53 durch zelluläre Stresssignale in Myc-Lymphomen die positive transkriptionelle Regulation von Sestrinen und phlda3 auslöst, wodurch sestrin2 AMPK α aktiviert und phlda3 AKT inhibiert. Des Weiteren nehmen wir an, dass diese Effekte zusammen zur Aktivierung des TSC1:TSC2 Komplexes und der nachfolgenden Inaktivierung des mTORC1 Komplexes führen. Ebenso führt die p53-abhängige Expression der Gene REDD1 und fbw7 zur Inhibition der mTOR- Funktion. Eine zentrale Rolle von p53 in Seneszenz scheint also, neben der Zellzykluskontrolle über p21 und der Induktion von SASP-Komponenten, die Kontrolle des mTOR Signalwegs zu sein. Die mit der mTOR-Inhibition typischerweise einhergehende Autophagie-Induktion wird in ihrer Bedeutung für den zellulären Seneszenz-Status kontrovers diskutiert (137,138). Der inhibierende Effekt von p53 auf die Funktion von mTOR ist bereits bekannt (110,133,139), jedoch bleibt der Einfluss der mTOR-Inhibition auf die Induktion zellulärer Seneszenz bisher unklar. Abbildung 3.24 gibt einen Überblick über den beschriebenen Signalweg und dessen Regulation via p53.

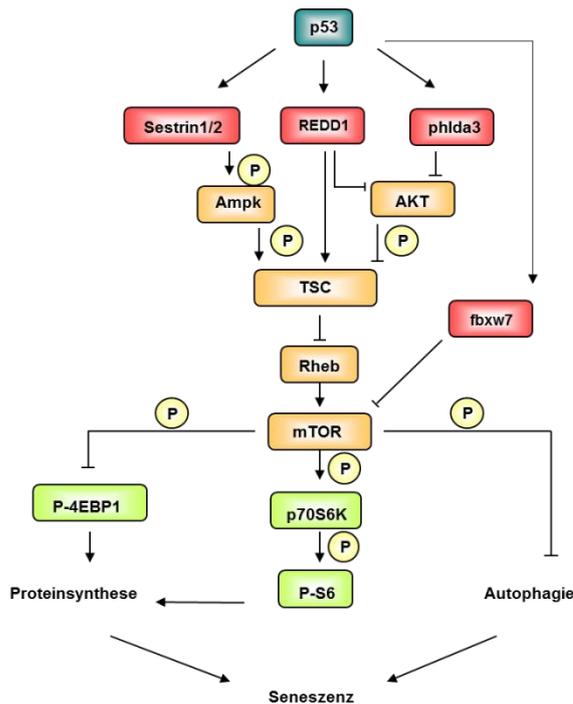


Abbildung 3.24 Regulation von mTOR durch sestrin1/2, phlda3, REDD1 und fbxw7. Sowohl die Sestrine, als auch phlda3 werden transkriptionell von p53 reguliert. Erfährt eine Zelle Stress, so kommt es durch Transkription dieser Gene über verschiedene Signalwege zur Aktivierung des TSC:TSC2-Komplex, was wiederum zur Inaktivierung von mTOR und seinen „downstream“ Effektormechanismen führt.

3.3.2 Aktivierung von AMPK α und Deaktivierung des AKT-Signalweges in seneszenten Lymphomzellen

Da in den getesteten Lymphomzellen sowohl phlda3 als auch sestrin2 nach Induktion eines DNA-Schadens bzw. nach Reaktivierung der p53-Funktion stark induziert wurden, müssten die beschriebenen Signalkaskaden entsprechende Modifizierungen zeigen. Die verminderte Phosphorylierung von AKT und seinem „downstream target“ Foxo3a (Forkhead-Box-Protein-3a) zeigen, dass der AKT-Signalweg in seneszenten Kontroll-Lymphomen nach Behandlung mit Adriamycin herunterreguliert wurde. Als Resultat aktiviert hypophosphoryliertes und somit kernständiges Foxo3a die Transkription antiproliferativer Gene. Die AMP-responsive Protein Kinase findet sich dabei, wie von Budanov und Karin beschrieben, als Antwort auf den Zellstress phospho-aktiviert und kann so ihrerseits TSC2 aktivieren (Abb. 3.25).

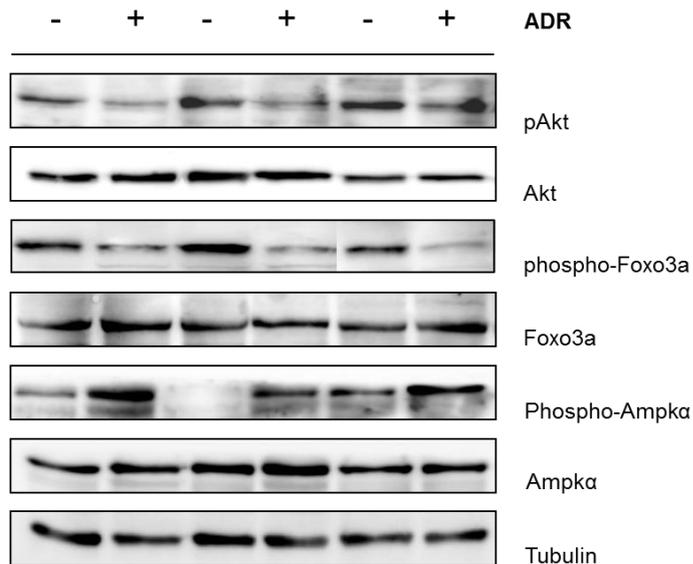


Abbildung 3.25 Immunoblot von AKT, Foxo3a und Ampka. In seneszenten Kontroll-Lymphomen ist Ampka aktiviert und der AKT-Signalweg inhibiert. Dies unterstützt die Annahme, dass p53 Ampka aktiviert und phlda3 den AKT-Signalweg negativ reguliert.

3.4 mTOR in TIS

3.4.1 Effektorfunktionen von mTORC1 in seneszenten Lymphomzellen

Als nächstes galt es zu testen, ob auch die Effektorfunktionen von mTOR in seneszenten Lymphomzellen negativ reguliert wurden. In Übereinstimmung mit der Inaktivierung von AKT und der Aktivierung von AMPK α war das direkte Ziel von mTORC1, die p70S6-Kinase, in seneszenten Lymphomzellen vermindert phosphoryliert. Die p70S6-Kinase ist eine Serin/Threonin-Kinase, deren Substrat das ribosomale Protein S6 (rpS6) ist. Das rpS6 ist eine Komponente der 40S-ribosomalen Untereinheit und somit an der Translation beteiligt. Es aktiviert die Translation so genannter 5' TOP-mRNAs (mRNAs mit terminalem Oligopyrimidintrakt in der 5'-nicht-translatierten Region). Deren Genprodukte sind ribosomale Proteine, Elongationsfaktoren und andere Translationsregulatoren (140). Es wurde gezeigt, dass rpS6 sowohl an der Regulation der Zellgröße, der Zellproliferation, als auch an der Glukosehomöostase beteiligt ist. Unerwartet konnte in seneszenten Lymphomzellen jedoch eine vermehrte Phosphorylierung und damit Aktivität dieses Translationsaktivators beobachtet werden. Ein weiteres Schlüsselprotein, das von mTORC1 aktiviert wird, ist 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) binding protein-1). Unphosphoryliertes 4E-BP1 bindet an RNA cap-bindendes Protein eIF-4E und hemmt dadurch die Kopplung an die mRNA und den Translations-Initiations-

Komplex, der zur Initiation der Translation cap-abhängiger mRNAs benötigt wird. Bei allen eukaryotischen mRNA-Molekülen wird bereits während der Transkription das 5'-Ende durch die Anheftung einer Kopfgruppe aus einem 7-Methylguanintriphosphat modifiziert. Häufig werden noch weitere Methylgruppen angefügt. Eine wichtige Funktion der Kopfgruppe besteht im Schutz der entstehenden RNA vor dem Abbau durch entsprechende Nukleasen. Darüber hinaus ist die Kopfgruppe ein Signal für den Transport der mRNA durch die Kernporen und wird für die Anheftung der mRNA an das entstehende Ribosom benötigt, wo sie das Auffinden des Startpunktes der Translation ermöglicht. Aktiviertes mTORC1 phosphoryliert 4E-BP1, dadurch wird eIF-4E freigesetzt und die cap-abhängige Translation initiiert (141). Die α - β - γ Isoformen repräsentieren den Phosphorylierungsstatus von 4E-BP1, wobei die α -Isoform das hypophosphorylierte 4E-BP1 darstellt und die γ -Isoform die hyperphosphorylierte Form (142). Wie durch den Immunoblot gezeigt, liegt 4E-BP1 in TIS Zellen in seiner hypophosphorylierten, inaktiven Form vor.

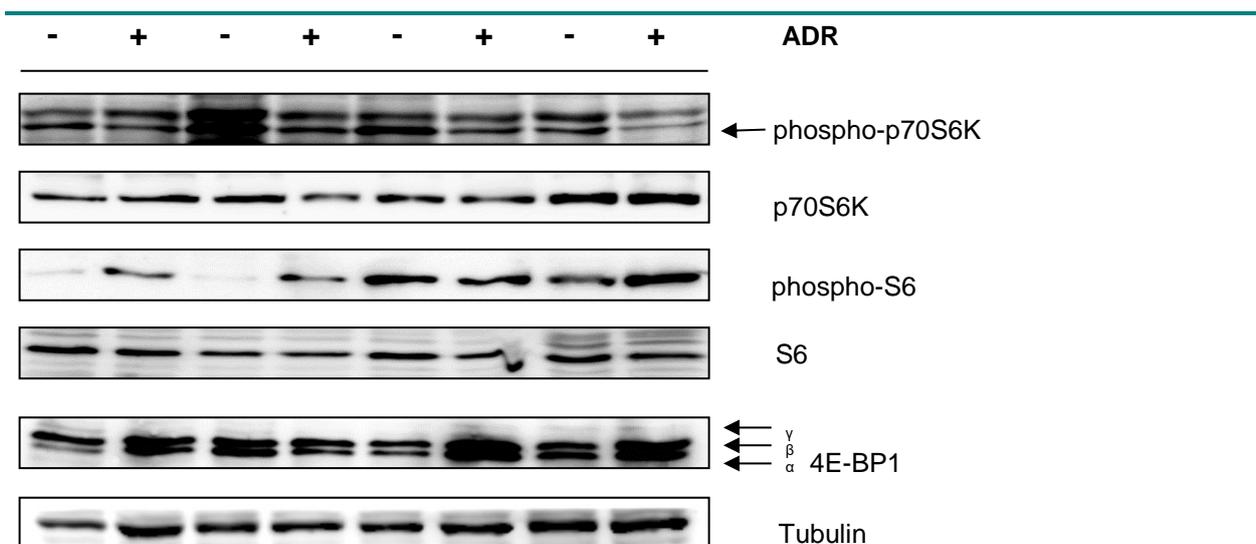


Abbildung 3.26 mTORC1-Signalweg in TIS-seneszenten Lymphomzellen. Das direkte Zielprotein von mTORC1, die p70S6K ist in seneszenten Zellen wie erwartet unter dem Einfluss einer geringeren mTORC1-Aktivität vermindert phosphoryliert. Ein weiteres „downstream“-Zielproteine aber, das rpS6, wird gegensätzlich aktiviert als erwartet. Dies deutet auf eine verstärkt Proteinsynthese in seneszenten Zellen hin, die unabhängig von mTORC1 reguliert wird. Das mTOR-Zielprotein 4E-BP1 liegt nach Behandlung mit Adriamycin wie erwartet in seiner hypophosphorylierten Form vor.

Die Aktivierung des ribosomalen Proteins S6 deutet darauf hin, dass die Proteinsynthese in seneszenten Zellen trotz Inhibierung des mTOR-Signalweges verstärkt abläuft oder zumindest nicht gänzlich inhibiert wird. Ein möglicher Mechanismus zur Erklärung dieser Beobachtung ist die Aktivierung von ERK

(Extrazellular-signal Regulated Kinases) in seneszenten Lymphomzellen. Die ERK gehören zu den Mitogen-aktivierten Kinasen (MAP-Kinasen) und zählen gemäß ihren modifizierten Gruppen zu den Serin/Threonin-Kinasen. Über die Phosphorylierung von p90RSK und p70RSK via ERK und die konsekutive Aktivierung von S6rp wird die Protein-Translation initiiert. Sind diese Signale stärker als die Inhibition der Proteintranslation durch mTOR-Inhibition, ist anscheinend weiterhin eine Aktivierung der Proteinbiosynthese möglich (Abb. 3.27).

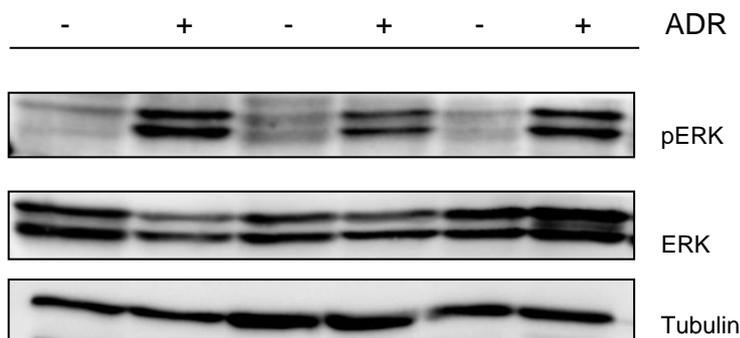


Abbildung 3.27 Aktivierung von ERK in seneszenten Lymphomzellen. Nach Seneszenz-Induktion mit ADR in bcl2 protektierten LCs wird phosphoryliertes und damit aktiviertes ERK detektiert.

3.4.2 Die pharmakologische Beeinflussung von Ampk α und AKT induziert prämaturne Seneszenz in Kontroll-Lymphomen

Geht man davon aus, dass wie in Abbildung 3.24 beschrieben, die p53-getriebene Aktivierung von AMPK α durch sestrin2 und die phlda3- sowie REDD1-induzierte Inhibition von AKT zu einer TSC-Aktivierung und damit einer mTOR-Hemmung führen, so sollte sich der Zustand prämaturner Seneszenz auch durch pharmakologische Aktivierung von AMPK α und Inhibition von AKT induzieren lassen. Metformin ist ein häufig eingesetztes Antidiabetikum zur Behandlung des Typ II Diabetes, dessen molekulares Wirkprinzip nicht vollständig geklärt ist. Zhou und Kollegen gelang der Nachweis einer Metformin abhängigen-AMPK α -Aktivierung in Hepatozyten, wodurch sich der inhibitorische Effekt auf die hepatische Glukosproduktion erklären lässt (143). Die Aktivierung von AMPK α durch Metformin und die konsekutive mTOR-Inhibition, sowie ein Proliferationsarrest konnte in Lymphom-Zelllinien bereits durch Shi und Kollegen gezeigt werden (144). Es stehen mehrere Wirkstoffe zur Inhibition von AKT zur Verfügung. Zur Behandlung der Lymphomzellen wurde der AKT-Inhibitor Triciribine (TCN) eingesetzt. Triciribine ist ein hochselektiver AKT/PKB-Inhibitor, der die

Phosphorylierung und somit Aktivierung von AKT1/2/3 selektiv hemmt (125). TCN bindet an die PH-Domäne von AKT und verhindert seine Rekrutierung an die Plasmamembran und die anschließende Phosphorylierung an T308 und S473. Während der Einsatz der einzelnen Inhibitoren bereits einen Effekt auf das Wachstumsverhalten der Lymphomzellen hatte, jedoch keinen seneszenten Arrest induzierte, führte die Kombinationsbehandlung mit beiden Substanzen zu einem stabilen Wachstumsarrest in der G1-Phase des Zellzyklus. Beide Substanzen wurden in subtoxischen Dosen eingesetzt, es wurde also keine relevante Zelltodinduktion beobachtet.

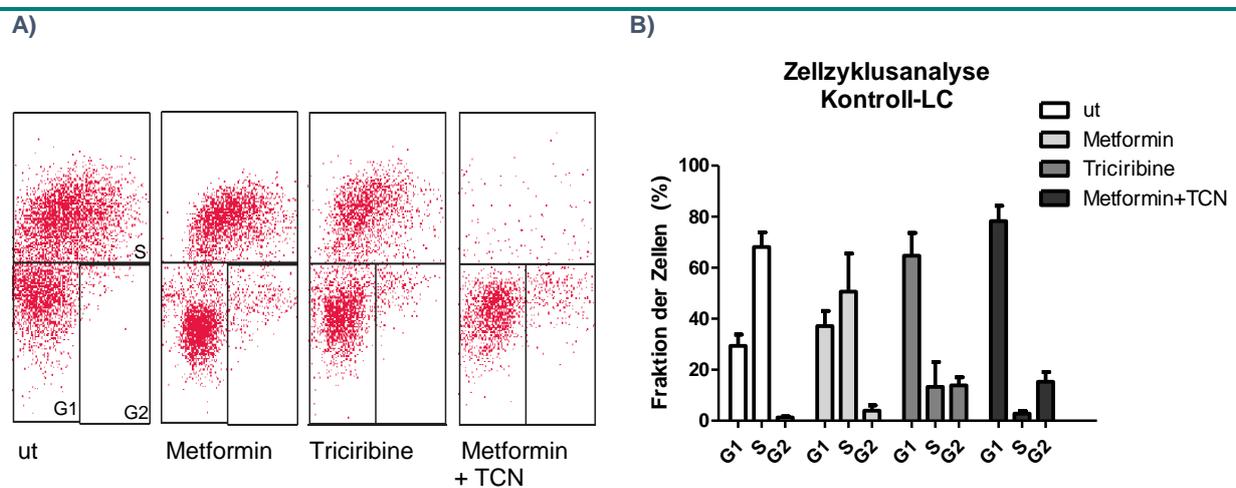


Abbildung 3.28 Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit dem AMPK α -Aktivator Metformin und dem AKT-Inhibitor Triciribine. Sowohl die Behandlung mit Metformin, als auch mit TCN führt zu einer Akkumulation von Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus mit einer Reduktion der sich teilenden Zellen (S-Phase). Dieser Effekt ist jedoch am stärksten ausgeprägt wenn beide Wirkstoffe miteinander kombiniert werden. In A) ist ein exemplarisches FACS Diagramm abgebildet. B) Dargestellt sind die Mittelwerte der Zellzyklusanalyse von 4 verschiedenen Lymphomen.

Der Wachstumsarrest ging einher mit SA- β -Gal-Reaktivität, die ausschließlich nach der Kombinationsbehandlung nachweisbar war. Die Doppelbehandlung mit Metformin und Triciribine führt also in Kontrolllymphomen zu einem seneszenten Wachstumsarrest, siehe Abb. 3.29.

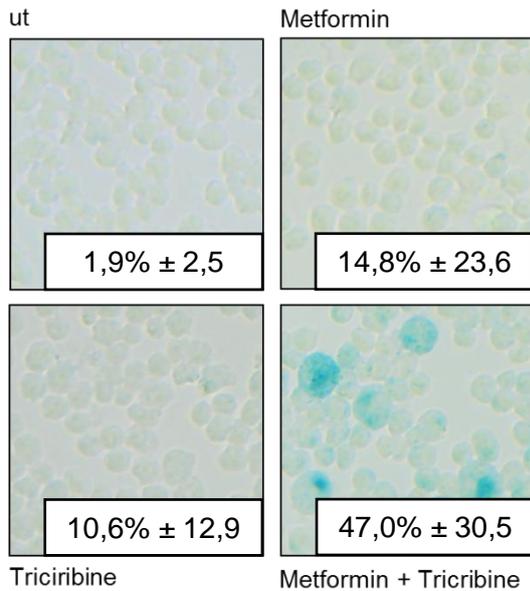


Abbildung 3.29 SA-β-Galactosidase Färbung nach Behandlung mit Metformin und TCN. Die Simultane Behandlung von bcl2 protektierten Lymphomzellen mit Metformin und TCN induziert SA-β-Gal Positivität. SA-β-Gal Positivität nach 5d Behandlung mit Metformin, AKT-Inhibitor oder beiden Substanzen. Abgebildet ist eine exemplarische Färbung der 4 untersuchten Lymphome.

Auch in p53-defizienten Lymphomzellen führten sowohl die Einzelbehandlung, sowie die Kombinationsbehandlung mit Metformin und TCN zu einer Akkumulation der Lymphomzellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Der Effekt auf den G1-Arrest ist nach Behandlung mit den Einzelsubstanzen ähnlich stark ausgeprägt wie nach der Doppelbehandlung, wobei jedoch insbesondere nach der Behandlung mit TCN und nach der Kombinationsbehandlung ein Verlust der S-Phase erkennbar ist, hier sowohl mit Anreicherung in der G1-, als auch der G2-Phase des Zellzyklus. Dennoch ist in der SA-β-Gal Färbung eine positive Anfärbbarkeit nur nach der Kombinationsbehandlung mit Metformin und TCN nachweisbar. Es kann also auch in p53-defizienten Lymphomen indirekt, d.h. durch proximale Blockade des mTOR-Signalweges, Seneszenz induziert werden (Abb. 3.30 und 3.31).

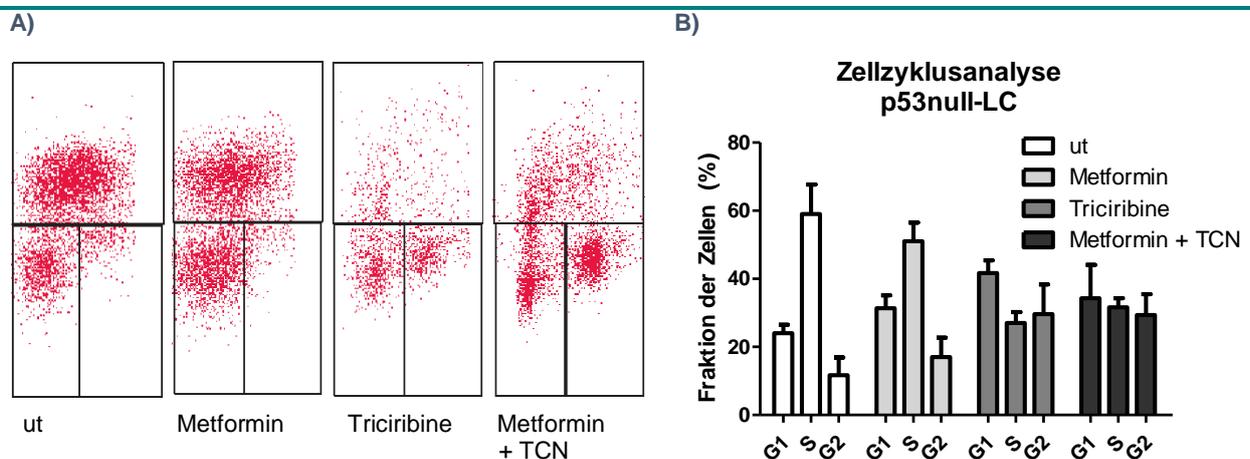


Abbildung 3.30 Zellzyklusanalyse von p53-defizienten Lymphomen nach Behandlung mit Metformin und Triciribine (TCN). Sowohl die Behandlung mit Metformin, als auch mit dem AKT-Inhibitor, als auch die Kombinationsbehandlung mit beiden Wirkstoffen führt zu einer Akkumulation an Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus mit einer Reduktion der sich teilenden Zellen. In A) ist ein exemplarisches FACS Diagramm abgebildet. B) Dargestellt sind die Mittelwerte der Zellzyklusanalyse von 3 verschiedenen Lymphomen

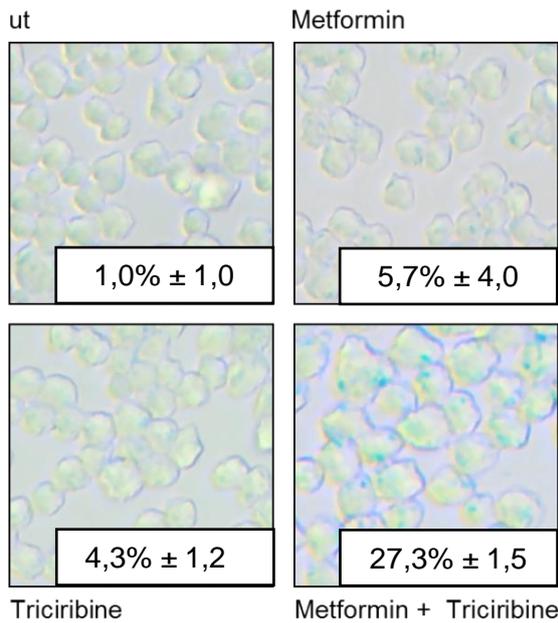


Abbildung 3.31 SA-β-Galactosidase Färbung nach Behandlung mit Metformin und TCN. Die Simultane Behandlung von p53-defizienten, bcl2-protectierten Lymphomzellen mit Metformin und TCN induziert SA-β-Gal Positivität. A) SA-β-Gal Positivität nach 5d Behandlung mit Metformin, AKT-Inhibitor oder beiden Substanzen.

3.4.3 TSC2-defiziente Zellen weisen einen Seneszenz-Defekt auf

Die p53-vermittelte Inhibition des mTOR-Signalweges erfolgt also über die gemeinsame Endstrecke der beiden Proteine sestrin2 und phlda3 (sowie REDD1) und deren Aktivierung von TSC2. Daher wurde als nächstes eine short-hairpin-Sonde gegen TSC2 hergestellt, um zu überprüfen, ob die Unterbrechung des Signalweges und damit die fehlende Inhibition von mTOR via p53 Seneszenz verhindern kann.

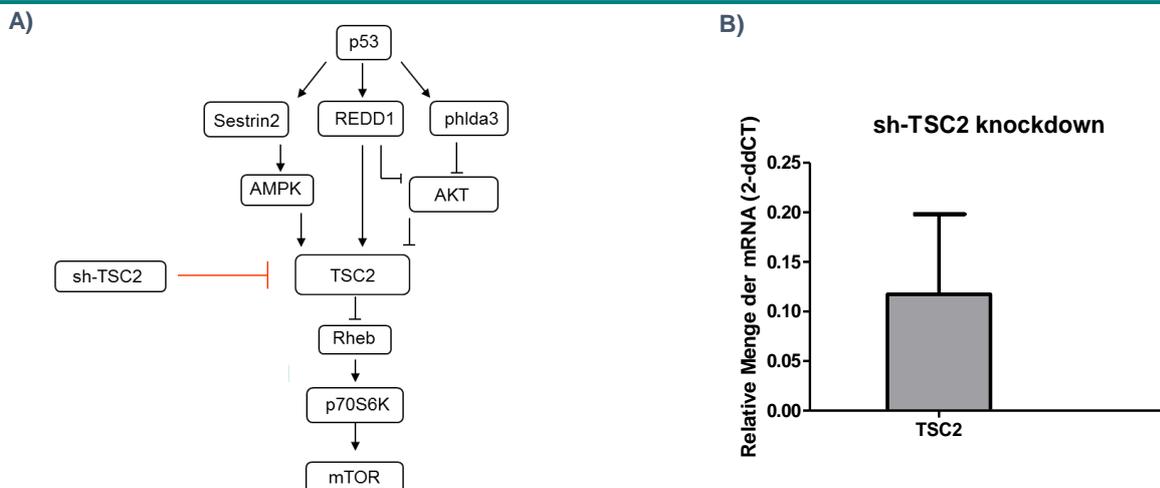


Abbildung 3.32 mTOR-Inhibition via p53 und TSC2. A) Modell des untersuchten Signalweges der mTOR-Inhibition via Aktivierung von p53. B) Der gegen TSC2 gerichtete short-hairpin führt zu einer deutlichen Verringerung der transkribierten mRNA relativ zu nicht infizierten Zellen.

Tatsächlich konnte in *bcl2*;sh-TSC2-transduzierten *myc*-Lymphomen nach Behandlung mit Adriamycin für fünf Tage eine geringere Fraktion der Zellen mit einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus detektiert werden. Es zeigte sich zwar eine Reduktion des Anteils der Zellen, die sich in der S-Phase befinden, jedoch war dieser geringer als in den Kontroll-Lymphomen (Vergleich Abb. 3.33 und 3.34). Auffällig war ein erhöhter Anteil an Zellen, die in der G2-Phase arretieren, bei ausbleibendem G1-Arrest.

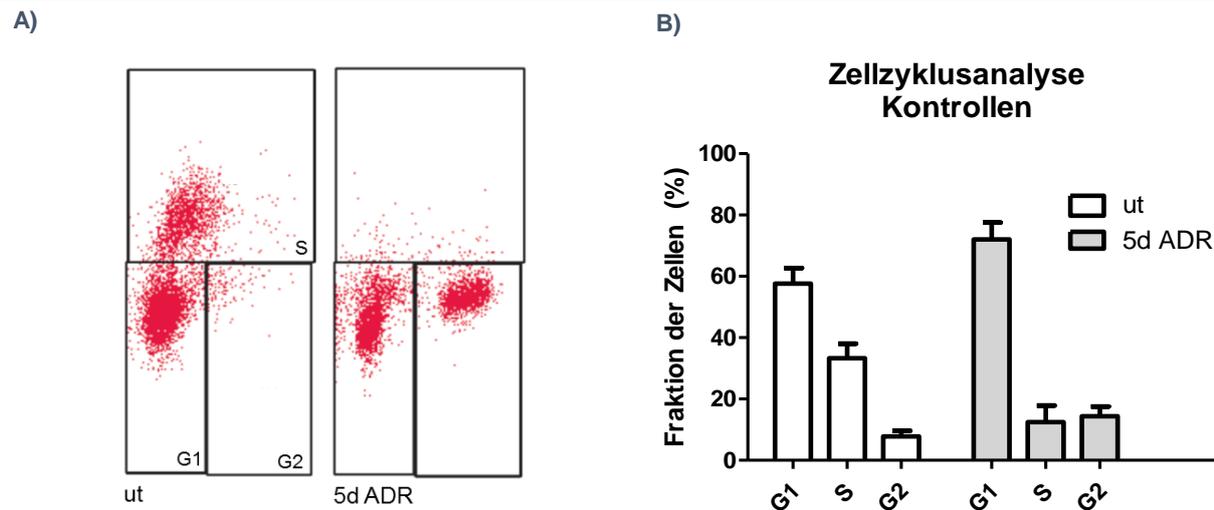


Abbildung 3.33 A) BrdU/PI-Färbung der mit Adriamycin behandelten Kontroll-Lymphome. Es ist ein exemplarischer Dot-Plot abgebildet. B) In der Quantifizierung von 10 individuellen Lymphomen zeigt sich ein Wachstumsarrest in der G1-Phase des Zellzyklus mit Verlust der S-Phase.

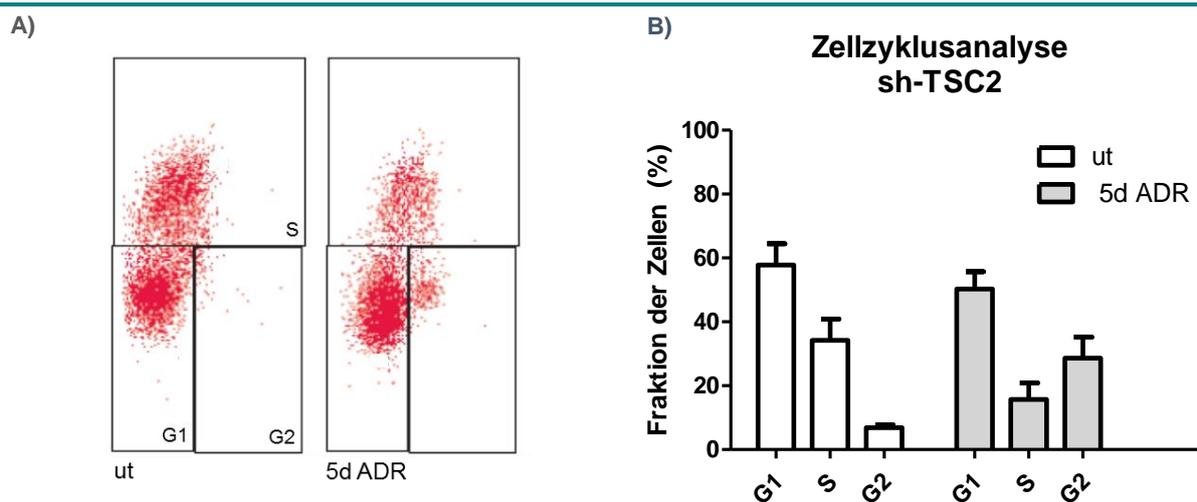


Abbildung 3.34 A) BrdU/PI-Färbung der mit Adriamycin behandelten TSC2-defizienten Lymphome. Es ist ein exemplarischer Dot-Plot abgebildet. B) In den sh-TSC2 infizierten Zellen fallen im Vergleich zu den Kontroll-Lymphomen ein verringerter Verlust der S-Phase, sowie ein verringerter G1-Arrest auf. n=10

Gleichfalls fanden sich weniger SA- β -Gal positive Zellen nach Behandlung mit Adriamycin, wobei der Effekt eher schwach ausgeprägt war. Die Inhibition von TSC2 und die damit einhergehende Unterbrechung der durch p53-Aktivierung initiierten Signalwege bedingen also einen partiellen Seneszenz-Defekt mit einer Akkumulation von Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus.

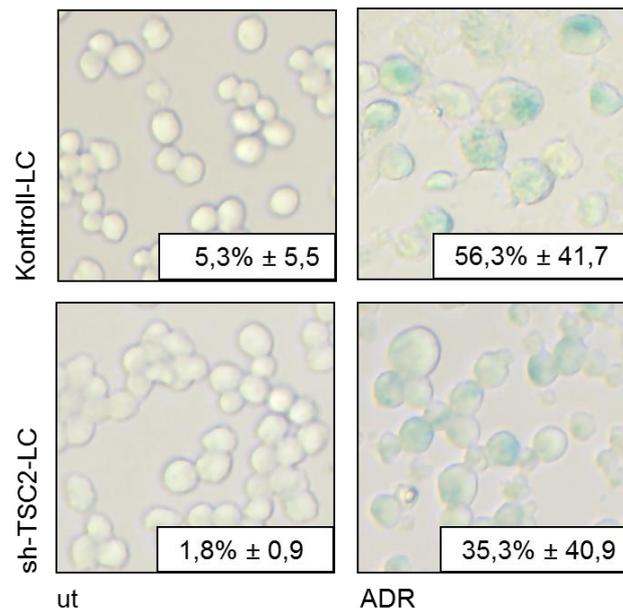


Abbildung 3.35 SA- β -Galactosidase Färbung in TSC2-defizienten Lymphomzellen und ihren entsprechenden Kontroll-Lymphomen. Die Anfärbbarkeit für SA- β -Galactosidase ist geringfügig weniger stark ausgeprägt. n=4.

3.5 Rapamycin-induziert prämatüre Seneszenz in *vitro* und in *vivo*

3.5.1 Rapamycin-induziert Seneszenz in p53-profizienten und -defizienten myc-Lymphomen

Die oben genannten Ergebnisse suggerieren eine p53-abhängige Inhibition des mTOR-Signalwegs und die konsekutive Induktion prämatürer Seneszenz. Dies führt zu der Überlegung, ob es möglich ist mTORC1 „downstream“ von p53 zu inhibieren und damit zelluläre Seneszenz auszulösen. Um dies zu testen, wurden Lymphomzellen mit myc;p53^{+/+} und myc;p53null Genotyp unter bcl2-Protektion für fünf Tage mit Rapamycin behandelt (siehe 2.2.2.3). Die Kontroll-Lymphome arretierten stabil (Abb. 3.36), p53null Lymphome zeigten eine ausgeprägt dezelerierte Wachstumskinetik. Bei Kontroll-Lymphomen war 10 Tage nach Behandlung mit Rapamycin kein Wachstum zu

detektieren, und bei p53-defizienten Lymphomzellen konnte eine dramatische Reduktion der Wachstumskinetik beobachtet werden, wobei jeweils nur bis Tag fünf mit Rapamycin behandelt wurde (Abb. 3.37).

Rapamycin-inuzierter Wachstumsarrest in Kontroll-Lymphomen

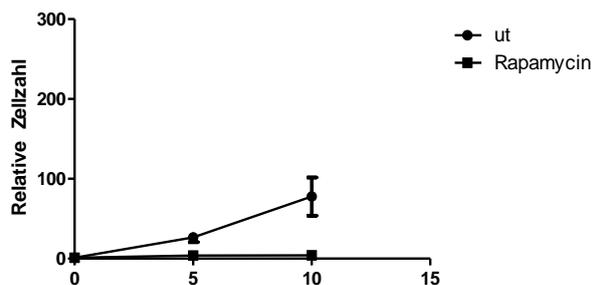


Abbildung 3.36 Proliferation nach Behandlung mit Rapamycin. In Kontroll-Lymphomen stellt sich nach fünftägiger Behandlung mit Rapamycin ein stabiler Proliferationsarrest ein. n = 5 Lymphome

Rapamycin-induzierter Wachstumsarrest in p53null-Lymphomen

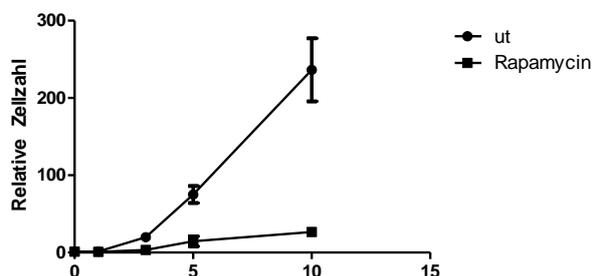


Abbildung 3.37 Proliferation nach Behandlung mit Rapamycin. Auch in p53- defizienten Zellen kann nach fünftägiger Behandlung mit Rapamycin eine dramatische Reduktion der Zellproliferation beobachtet werden. n = 5

Neben den Wachstumsbeobachtungen wurden auch die Färbung mit SA- β -Galactosidase, sowie der Zellzyklus in beiden Genotypen untersucht. Sowohl die typische Färbung des lysosomalen Kompartimentes, als auch der für die Seneszenz charakteristische G1-Arrest war in p53-profizienten und p53-defizienten Lymphomen nachweisbar. Diese Daten zeigen, dass die Induktion von „klassischer“ Seneszenz „downstream“ von p53 durch Inhibierung von mTORC1 möglich ist und selbst p53-defiziente Zellen dabei nicht in der G2-Phase des Zellzyklus (wie in Abwesenheit von p53 möglicherweise zu erwarten), sondern Seneszenz-typisch in der G1-Phase arretieren. Inwieweit das stark reduzierte, aber nicht aufgehobene Wachstumsverhalten und die nicht unerhebliche S-Phase-Fraktion in Rapamycin-exponierten p53-defizienten

Zellen eine insensitive Subpopulation oder eine insgesamt weniger robuste bzw. „tiefe“ Form zellulärer Seneszenz darstellt, muss an dieser Stelle offen bleiben.

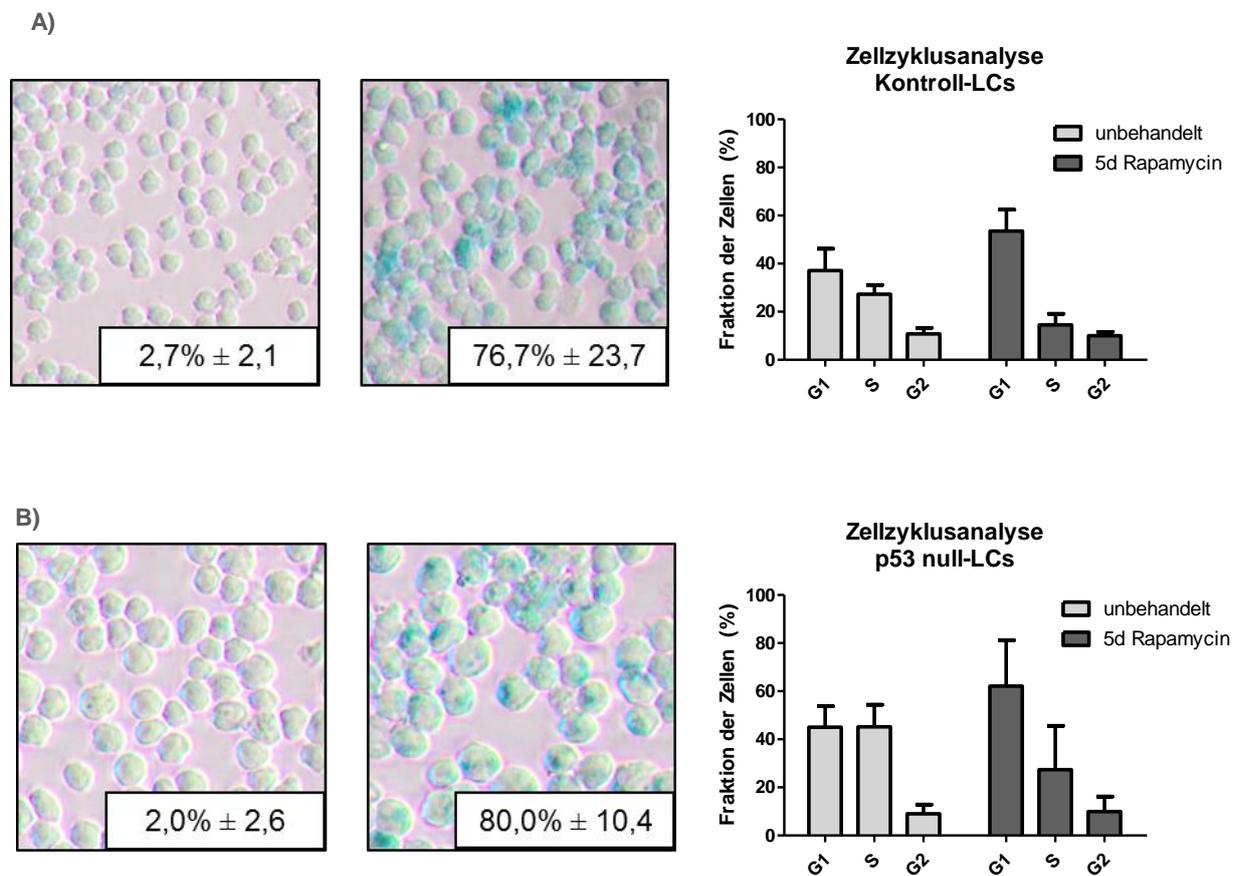


Abbildung 3.38 Rapamycin induziert einen SA-β-Galactosidase positiven Arrest unabhängig vom p53-Status. A) Kontroll-Lymphome und B) p53-defiziente Lymphome arretieren nach fünftägiger Behandlung mit Rapamycin und färben sich positiv in der SA-β-Gal Färbung. Es wurden jeweils 5 unterschiedliche Lymphome untersucht.

Die Signaling-Effekte der Behandlung mit Rapamycin sollten nicht nur zellmorphologisch, sondern auch auf Proteinebene untersucht werden (Abb. 3.39). Zunächst wurden dafür die „downstream“-Effektoren von mTORC1 untersucht. Bei 4E-BP1 fand sich entsprechend der verminderten Aktivität von mTORC1 eine starke Betonung der hypophosphorylierten Form, die durch die untere von drei Banden dargestellt wird (α-Isoform). Auch das Zielprotein der p70S6K, das ribosomale Protein S6 wurde unter dem Einfluss von Rapamycin vermindert phosphoryliert vorgefunden. Des Weiteren wurden Marker eines Zellzyklusarrests bzw. Seneszenz-Marker unter Behandlung mit Rapamycin untersucht. Dafür wurden p21 und das Rb-Protein

detektiert. p21 war, wie in TIS und OIS, induziert, Rb zeigte sich ebenfalls analog zu TIS und OIS vermindert phosphoryliert, also aktiv. Damit fand sich in Rapamycin behandelten Zellen auch proteinanalytisch der Hinweis auf einen G1-Block. p21 wird von p53 reguliert. Da das p53-Protein in Rapamycin behandelten Zellen jedoch nicht verstärkt exprimiert wurde, spielen hier vermutlich auch p53-unabhängige Mechanismen der p21-Aktivierung eine Rolle. Weiterhin ist ein Zusammenhang zwischen Seneszenz und Autophagie, sowie die Induktion von Autophagie durch Hemmung von mTOR beschrieben (137). Autophagie ist ein kataboler Prozess, bei dem mit Hilfe von lysosomaler Degeneration überschüssige oder sogar schädliche Proteine und Zellorganellen degradiert werden. Die Formation von Autophagosomen kann durch erhöhte Level des LC3-II-Proteins nachgewiesen werden. Wie die Abbildung 3.39 zeigt, war auch in unserem Modell der Rapamycin induzierten Seneszenz eine deutliche Konversion von LC3-I zu LC3-II nachweisbar.

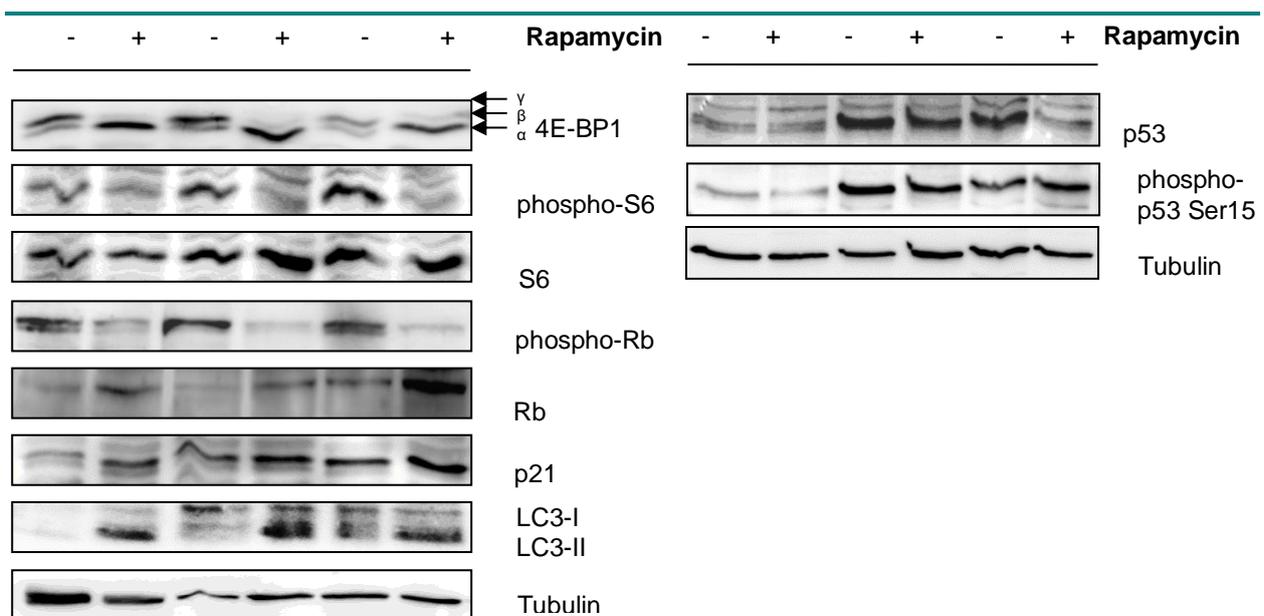
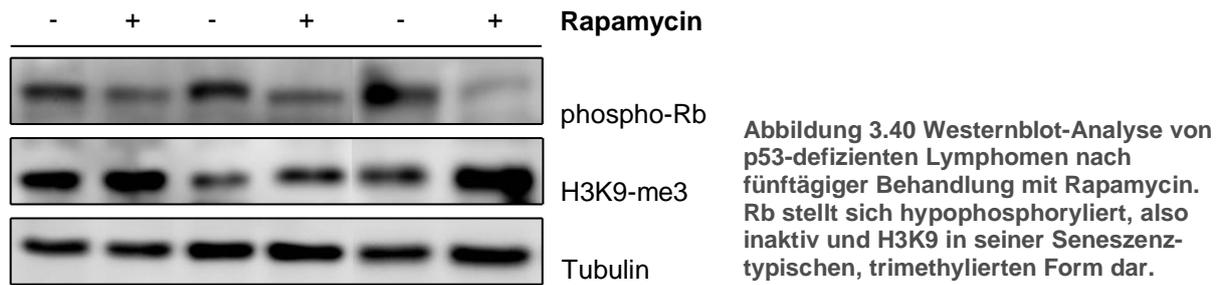


Abbildung 3.39 Immunoblot von Kontroll-Lymphomzellen nach 5 Tagen Behandlung mit Rapamycin. Es erfolgte die Analyse von mTORC1-Effektoren und Seneszenz-Markern. Die mTORC1 targets 4E-BP1 und S6 werden wie erwartet negativ reguliert und die Inhibitoren des Zellzyklus Rb und p21 im Sinne einer Inhibition des Zellzyklus. Der Phosphorylierungsstatus von p53 ändert sich in Rapamycin behandelten Zellen nicht im Vergleich zu unbehandelten Lymphomen.

Auch in p53-defizienten Lymphomzellen wurden durch Behandlung mit Rapamycin Marker eines Zellzyklusarrests bzw. Seneszenz-Marker entsprechend reguliert. Das Retinoblastom-Protein lag in seiner aktiven, hypophosphorylierten Form vor und auch der Seneszenz-Marker H3K9 ist in seiner trimethylierten Form nachweisbar.



Ein weiteres Merkmal der Seneszenz ist die Produktion bestimmter Zytokine und ECM Faktoren, der SASP. Die Untersuchung des SASPs in Rapamycin behandelten Lymphomzellen erfolgte mittels RTq-PCR. Wie in Abbildung 3.41 dargestellt – man beachte die Magnitude (Fold-Induction, y-Achse) der Induktion von SASP-Faktoren unter Rapamycin im Vergleich zu ADR-induzierter Seneszenz in Kontroll-Lymphomen – wurde weder in Kontroll-Lymphomen, noch in p53-defizienten Lymphomen eine signifikant vermehrte Produktion dieser Faktoren beobachtet.

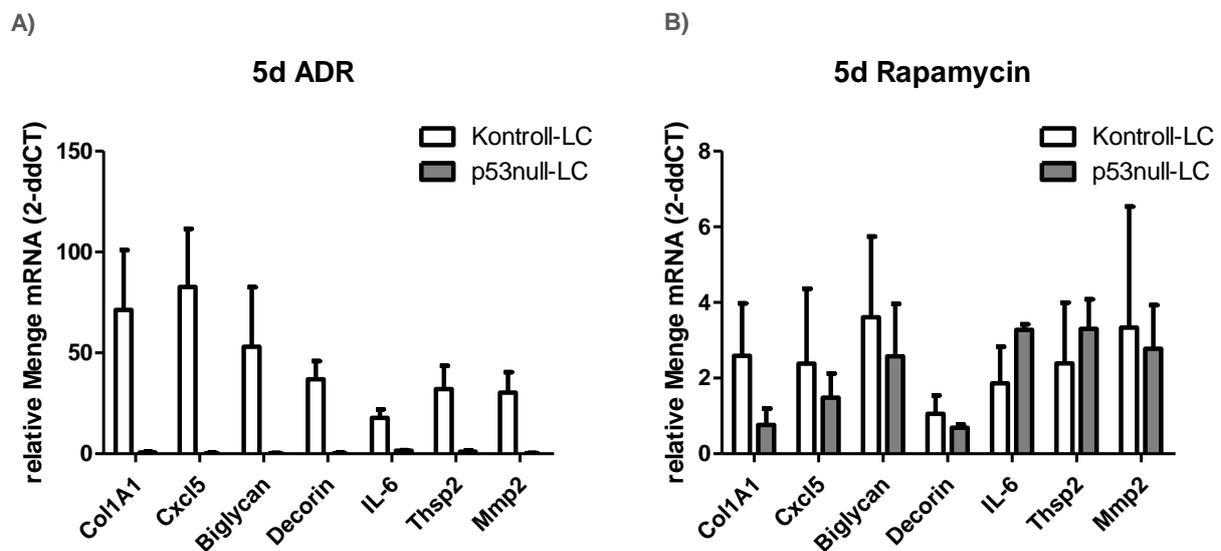


Abbildung 3.41 Die Rapamycin-Behandlung führt nicht zur Induktion eines SASP. A) Nach 5 Tagen Behandlung mit ADR produzieren seneszenzente Lymphomzellen vermehrt ECM-Proteine und Zytokine wie hier anhand der mRNA Menge dargestellt. n=5 B) Nach Behandlung mit Rapamycin wird dieser Effekt trotz Induktion anderer Seneszenz-Marker nicht beobachtet. n=3

3.5.2 Rapamycin-induziert Seneszenz in TSC2-defizienten Lymphomzellen

Wie bereits unter 3.4.3 beschrieben weisen TSC2-defiziente Lymphomzellen einen Seneszenz-Defekt auf. Der Anteil von wachstumsarretierten Zellen nach Behandlung

mit Adriamycin in der G1-Phase war vermindert zu Gunsten der G2-Phase. Ein S-Phase-Arrest, also ein Verlust der proliferativen Kapazität war sowohl in den Kontroll-Lymphomen, als auch in den TSC2-defizienten Lymphomen zu beobachten. Da wir durch Rapamycin Behandlung eine Seneszenz-Induktion downstream von TSC2 postulieren, sollte Rapamycin auch in TSC2-defizienten Zellen Seneszenz auslösen. In der Zellzyklusanalyse mittels BrdU/PI-Färbung konnte gezeigt werden, dass durch Rapamycin im Vergleich zu Adriamycin ein deutlicherer G1-Arrest in TSC2-defizienten Zellen induziert wird. Wie bereits in 3.4.3 beschrieben zeigt sich in sh-TSC2-infizierten Lymphomzellen zwar eine Reduktion des Anteils der Zellen, die sich in der S-Phase befinden, jedoch war dieser etwas geringer als in den Kontroll-Lymphomen.

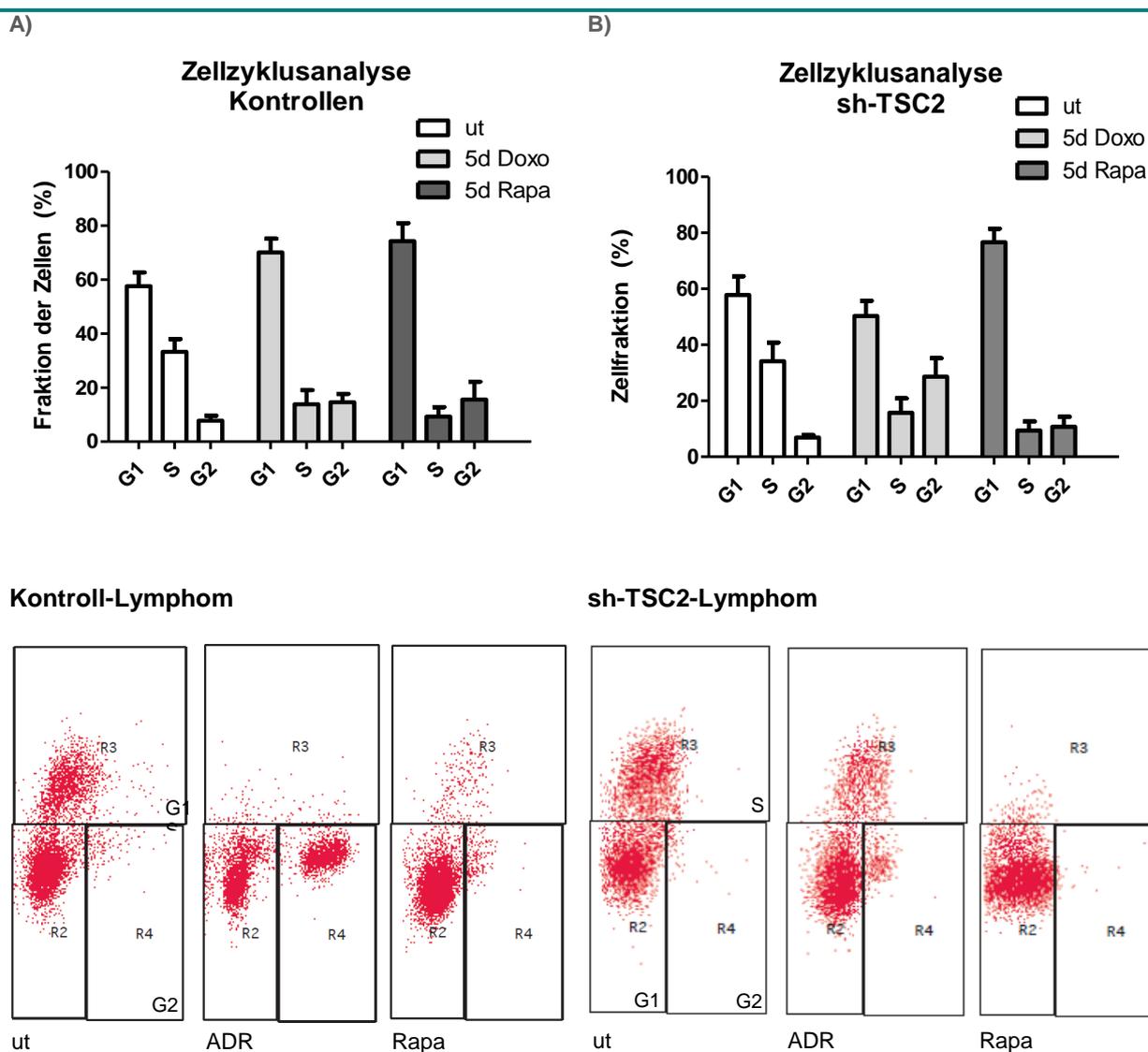


Abbildung 3.42 Zellzyklusanalyse von Kontroll-Lymphomen und TSC2-defizienten Lymphomen nach Behandlung mit ADR und Rapamycin A) In Kontroll-Lymphomen wird sowohl durch Behandlung mit Adriamycin, als auch durch Behandlung mit Rapamycin ein Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus

induziert. n=10 B) Auch in TSC2-defizienten Zellen induziert Adriamycin einen G1-Arrest, Rapamycin induziert auch in TSC2-defizienten Zellen einen ausgeprägten G1-Arrest.

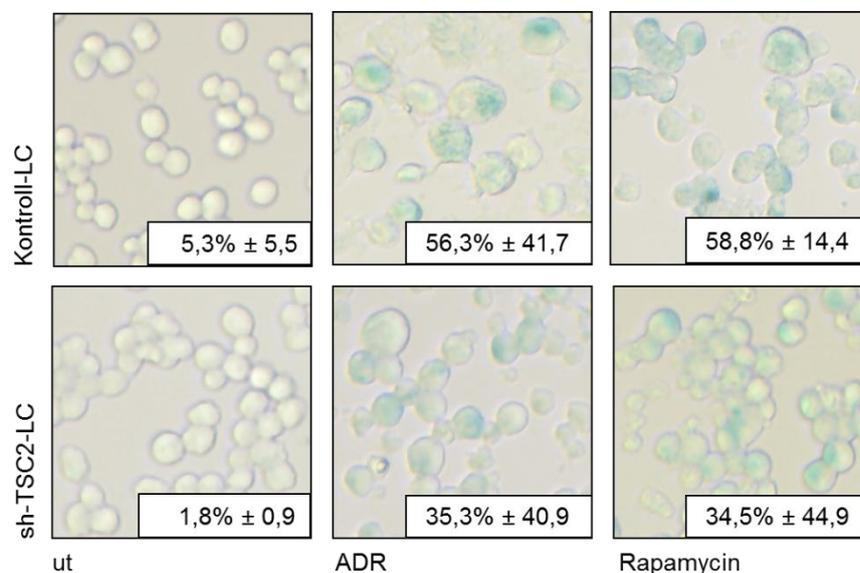


Abbildung 3.43 SA-β-Gal Färbung von Lymphomzellen nach fünftägiger Behandlung mit Adriamycin oder Rapamycin. In der oberen Reihe sind Kontroll Lymphomzellen dargestellt, in der unteren Reihe das gleiche Lymphom, jedoch mit einem short-hairpin gegen TSC2 infiziert.

3.5.3 Rapamycin hat Antitumor-Aktivität und induziert Seneszenz in Kontroll-Lymphomen *in vivo*

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob Rapamycin auch Seneszenz *in vivo* induzieren kann. Dafür wurden myc;bcl2-Lymphome (n=10) in gesunde Mäuse transplantiert. Die Behandlung mit Rapamycin zum Zeitpunkt systemischer Lymphom-Manifestation führte zu einer signifikanten Verlängerung des Überlebens, verglichen mit Placebo (p= 0,000003), in der Rapamycin-exponierten Kohorte. Wie in Abb. 3.44 dargestellt, überlebten die Mäuse nach Beginn des Lymphom-Wachstums im Median sieben Tage in der Placebo-behandelten Gruppe und 21 Tage in der Rapamycin-behandelten Gruppe.

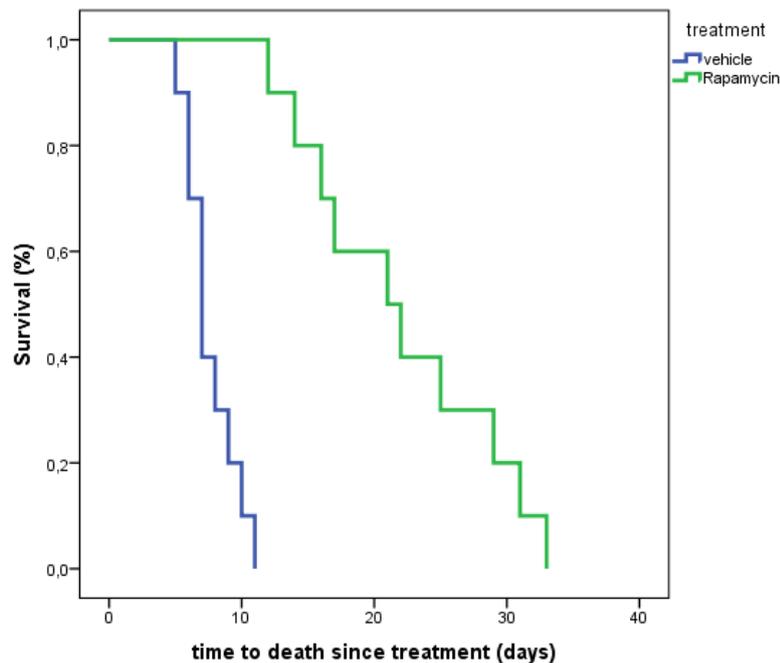


Abbildung 3.44 Kaplan-Meier-Kurve. Dargestellt ist die Überlebenszeit der mit Kontroll-Lymphomen transplantierten Mäuse nach Beginn der Behandlung mit Placebo oder Rapamycin. Das mediane Überleben lag bei 7 bzw. 21 Tagen ($p = 0,000003$).

Abbildung 3.45 zeigt, dass sich auch im Paarvergleich für individuelle Lymphome ein verlängertes Überleben nach Behandlung mit Rapamycin ergibt. Jedes individuelle Lymphom profitiert von der Rapamycin-Behandlung verglichen zu seinem Spontanverlauf unter mock-Therapie.

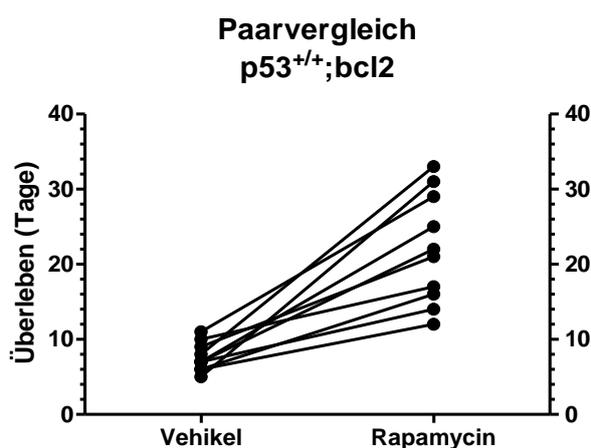
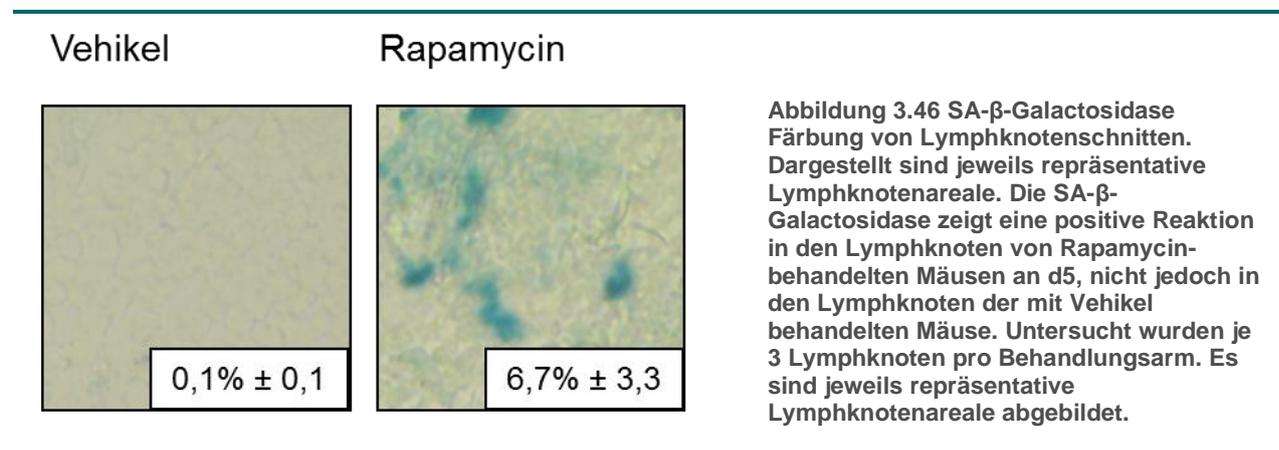


Abbildung 3.45 Paarvergleich der p53^{+/+};bcl2 Lymphome. Dargestellt ist die Überlebenszeit der individuellen Lymphome nach Behandlung mit Placebo oder Rapamycin.

Da wir bereits *in vitro* zeigen konnten, dass Rapamycin in Lymphomzellen mit einem Apoptose-Defekt Seneszenz auslösen kann, stellt sich auch *in vivo* die Frage, ob das

verlängerte Überleben mit der Induktion von Seneszenz assoziiert ist. Es finden sich nach fünftägiger Behandlung mit Rapamycin zahlreiche seneszente Lymphknotenareale. Rapamycin führt also *in vitro* und *in vivo* zu Seneszenz, und trägt mutmaßlich über Seneszenz-Auslösung zu einem verlängerten Gesamtüberleben bei.



3.5.4 Rapamycin hat Antitumor-Aktivität in p53-defizienten Lymphomen *in vivo*

In vitro führte die Behandlung von p53-defizienten Lymphomen mit Rapamycin zu einem SA-β-Gal positiven Zellzyklus-Arrest. Daher wurden p53null;myc;bcl2-Lymphome, die in gesunde Mäuse transplantiert wurden, mit Vehikel oder Rapamycin behandelt um zu untersuchen, ob die Behandlung mit Rapamycin auch *in vivo* eine entsprechende Antitumor-Aktivität hat. Ebenso erfolgte die Behandlung mit CTX und eine Kombinationsbehandlung mit CTX + Rapamycin, da wir einen synergistischen Effekt von Zytostatikum und mTOR-Inhibitor erwarteten. Das mediane Überleben der mit Rapamycin behandelten Mäuse lag bei 32 Tagen ($p=0,0007$), die mit Rapamycin und CTX behandelten Mäuse überlebten im Median 36 Tage ($p=0,0001$), wobei der Unterschied zwischen beiden Gruppen nicht signifikant war ($p=0,993$) (Abb. 3.47). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich des Gesamtüberlebens der mit CTX mono, mit Rapamycin oder mit CTX + Rapamycin behandelten Mäuse ($p=0,742$ bzw. $p=0,789$). Rapamycin ist also auch *in vivo* eine Substanz mit antitumorale Aktivität, selbst in p53-defizienten Lymphomen, wobei die Hinzunahme des Zytostatikums CTX keinen additiven Effekt erzeugt.

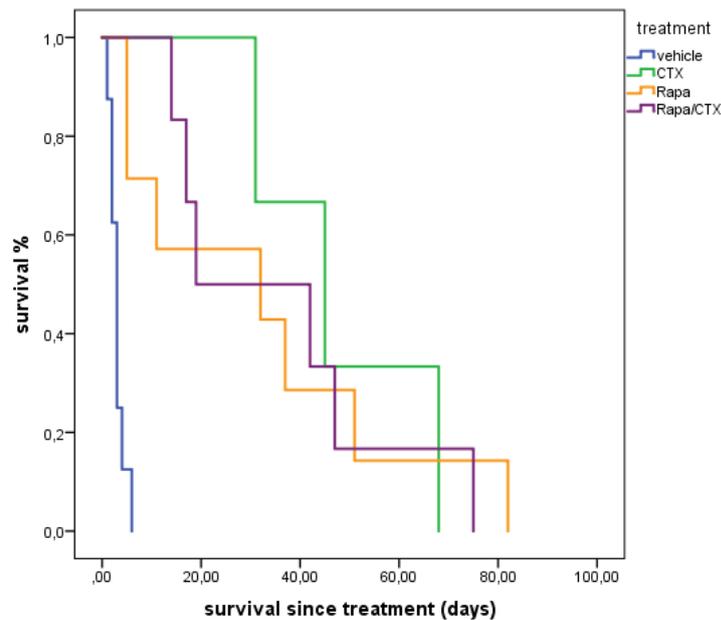


Abbildung 3.47 Kaplan-Meier-Kurve. Dargestellt ist die Überlebenszeit der mit p53-defizienten Lymphomen transplantierten Mäuse nach Behandlung mit Vehikel, CTX, Rapamycin oder Rapamycin + CTX. Das mediane Überleben lag bei 3, 48, 32 bzw. 36 Tagen.

Der Unterschied im medianen Überleben der Kontroll-Lymphome verglichen mit den p53-defizienten Lymphomen nach Behandlung mit Rapamycin ist statistisch nicht signifikant ($p=0,143$) (Abb. 3.48).

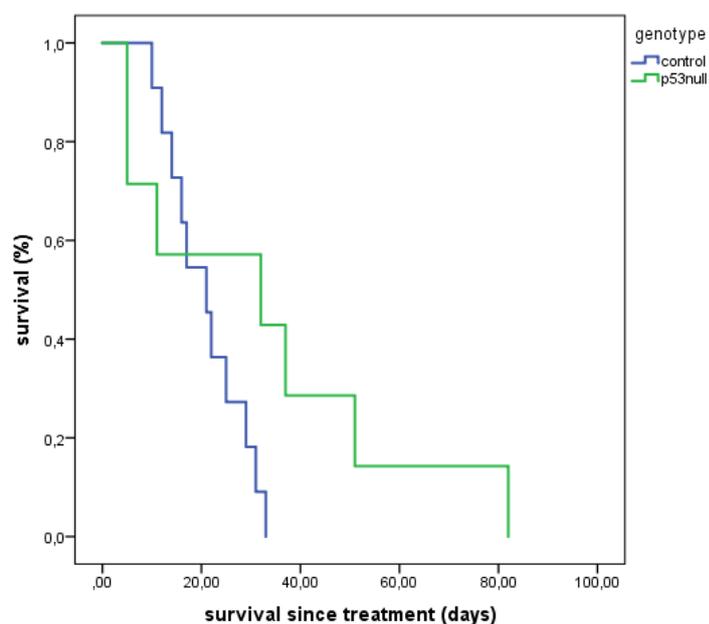


Abbildung 3.48 Kaplan-Meier-Kurve. Dargestellt ist die Überlebenszeit von Kontroll-Lymphomen oder p53-defizienten Lymphomen nach Behandlung mit Rapamycin.

Auch für die p53-defizienten Lymphome ergibt sich im Paarvergleich ein Überlebensvorteil nach Behandlung mit Rapamycin, verglichen mit den Vehikel-behandelten Lymphomen.

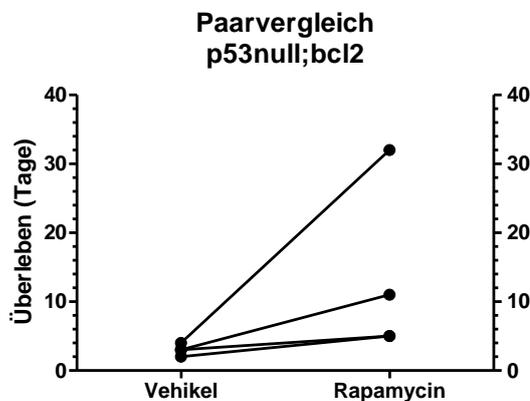


Abbildung 3.49 Paarvergleich der p53null;bcl2-Lymphome. Dargestellt ist die Überlebenszeit der individuellen Lymphome nach Behandlung mit Placebo oder Rapamycin.

Interessanterweise finden sich sowohl nach fünftägiger Behandlung mit CTX, als auch mit Rapamycin zahlreiche seneszente Lymphknotenareale. Nach Kombinationsbehandlung mit CTX und Rapamycin waren makroskopisch nur noch sehr kleine Lymphom-Residuen nachweisbar, jedoch zeigten auch diese eine positive Anfärbbarkeit für SA- β -Galactosidase.

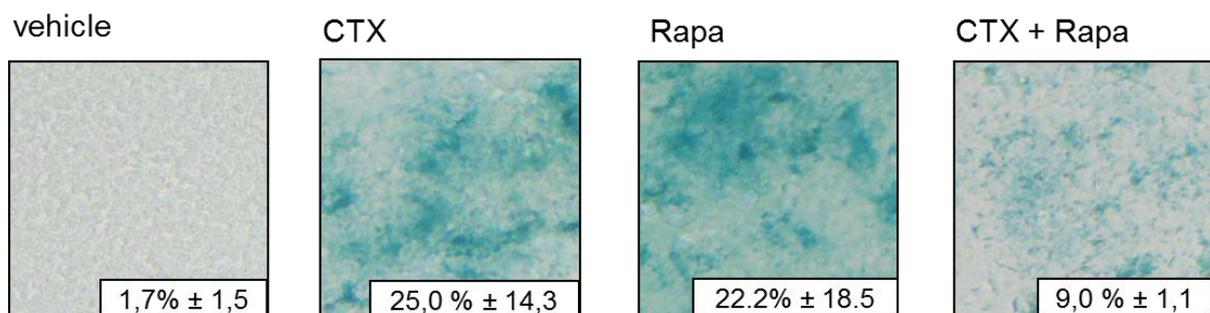


Abbildung 3.50 SA- β -Galactosidase Färbung von Lymphknotenschnitten p53-defizienter Lymphome nach Behandlung mit Vehikel, CTX, Rapa oder CTX + Rapa. Dargestellt sind jeweils repräsentative Lymphknotenareale. Die SA- β -Galactosidase zeigt eine positive Reaktion in den Lymphknoten von CTX, Rapamycin oder CTX + Rapamycin behandelten Mäusen an d5, nicht jedoch in den Lymphknoten der mit Vehikel behandelten Mäuse.

3.5.5 Pharmakologische Induktion von Seneszenz in Rapamycin-resistenten Lymphomzellen

Die bislang erläuterten Ergebnisse konnten zeigen, dass eine gezielte Therapie mittels Rapamycin zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums, mutmaßlich durch Aktivierung von Seneszenz, führt. Zeitgleich wirft das schnelle Tumor-outgrowth Fragen nach den zugrundeliegenden Mechanismen auf. Dabei ist die Entwicklung einer Rapamycin-Resistenz eine Möglichkeit; genauso ist auch zu vermuten, dass die Rapamycin-unerreichten oder –insensitiven Lymphomzellen, die nie seneszent waren, nun klinisch überwachsen. In den etablierten Lymphomen war der Therapieeffekt nur von kurzer Dauer, wobei entweder präexistente Seneszenz-Defekte oder aber auch neu erworbene Resistenzmechanismen eine Rolle spielen können. Sowohl die Behandlung mit dem Ampk α -Aktivator Metformin und mit dem AKT-Inhibitor TCN, als auch die Doppelbehandlung mit beiden Substanzen induzierten einen G1-Arrest in p53-profizienten und -defizienten Lymphomen. Dementsprechend war es für uns von Interesse zu testen, ob diese Effekte auch in Rapamycin-resistenten Lymphomen reproduzierbar waren – also in Zellen, in denen pharmakologisch Rapamycin zwar nicht mehr mTOR inhibieren kann, aber damit keineswegs notwendigerweise eine Insensitivität gegenüber mTOR-inhibitorischem Upstream-Signaling besteht (145). Dafür wurden Lymphomzellen mit Rapamycin behandelt, bis sie trotz regelmäßiger Behandlung ein gleiches Wachstumsverhalten wie die entsprechenden unbehandelten Lymphomzellen zeigten (d25). Wie in Abbildung 2.3 dargestellt, konnten Rapamycin resistente Lymphomzellen etabliert werden. Trotz der Resistenz auf den mTOR-Inhibitor gelang es einen G1-Arrest durch Behandlung mit entweder Triciribine alleine, sowie durch Doppelbehandlung mit Metformin und TCN zu induzieren. Dabei war TCN in einer höheren Dosierung insbesondere in den p53-defizienten Lymphomzellen auch stärker wirksam. Die Kombination mit Metformin führt in p53-defizienten Zellen nicht zu einer signifikanten Zunahme des Arrestes, der vor allem an einer Abnahme der S-Phase mit Zunahme des G2-Arrestes erkennbar ist.

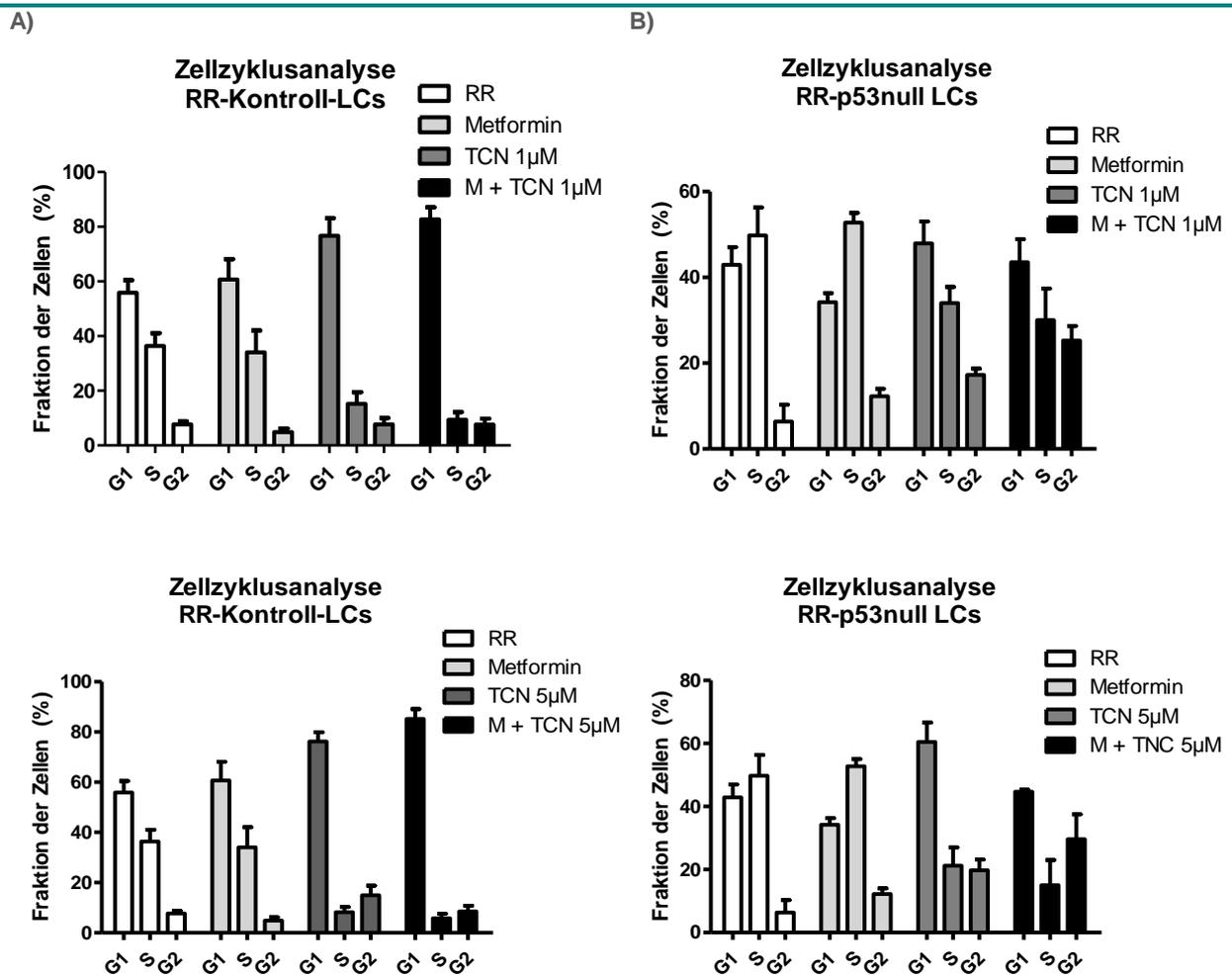


Abbildung 3.51 Zellzyklusanalyse von Rapamycin-resistenten (RR) Kontroll-Lymphomen und p53null-Lymphomen nach Behandlung mit Metformin, Triciribine (TCN) oder der Kombinationsbehandlung mit beiden Substanzen. Auch in Rapamycin-resistenten Lymphomen kann ein G1-Arrest mit Verlust der S-Phase nach Behandlung mit den jeweiligen Substanzen induziert werden, sowohl in A) Kontroll-Lymphomzellen, als auch in B) p53-defizienten Lymphomzellen.

Analog der Behandlung in Rapamycin-sensitiven Lymphomen konnte auch in den Rapamycin-resistenten Lymphomen nur nach Doppelbehandlung mit Metformin und Triciribine in begrenztem Ausmaß ein seneszenten Arrest mit positiver Anfärbbarkeit für SA- β -Galactosidase nachgewiesen werden.

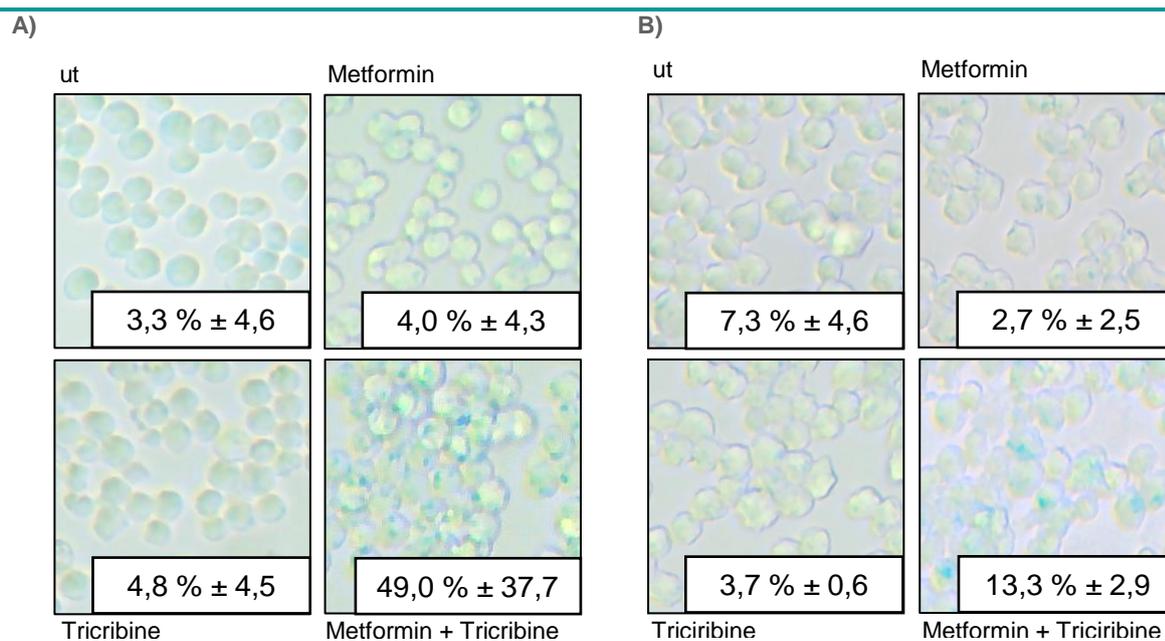


Abbildung 3.52 SA- β -Galactosidase Färbung von Rapamycin resistenten (RR) Kontroll-Lymphomen und p53null-Lymphomen nach Behandlung mit Metformin, Triciribine (TCN) oder der Kombinationsbehandlung mit beiden Substanzen. Auch in Rapamycin-resistenten Lymphomen kann eine positive Anfärbbarkeit für SA- β -Galactosidase nach Doppelbehandlung mit Metformin und Triciribine nachgewiesen werden, sowohl in A) Kontroll-Lymphomzellen, als auch in geringerem Ausmaß in B) p53-defizienten Lymphomzellen.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt durch Untersuchungen am E μ -myc-Mausmodell, dass die Aktivierung von p53 und seinen Zielgenen in myc-transgenen Lymphomzellen zu einem stabilen, seneszenten Wachstumsarrest führen kann, und betont damit die zentrale Funktion von p53 in der Induktion zellulärer Seneszenz. Des Weiteren wird die dabei wichtige Rolle einer p53-vermittelten Regulation des mTOR-Signalwegs über die Transkription der Gene *sestrin2*, *phlda3* und ferner *REDD1* in prämaturer Seneszenz aufgezeigt.

Eine wesentliche und bisher unzureichend geklärte Frage ist, über welche Signalwege zelluläre Seneszenz ausgelöst wird. Wie bisherige Untersuchungen zeigen, kann zelluläre Seneszenz als Antwort auf Stresssignale unter anderem durch die Tumorsuppressoren p53, p19ARF, p16INK4A/pRb und, interessanterweise, PTEN-Verlust induziert werden. Der Fokus dieser Arbeit lag auf den durch p53-induzierten Signalwegen, welche zur Induktion von prämaturer Seneszenz in Lymphomen führen. Obwohl p53 für zelluläre Seneszenz essentiell ist, besteht weiterhin Unklarheit über die involvierten Gene und Signalwege, welche Seneszenz vermitteln können. Aktiviertem p53 werden viele Funktionen zugeschrieben, wobei insbesondere die Transkription seiner Zielgene durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen untersucht worden ist. Beinahe alle natürlich vorkommenden Mutationen des p53-Gens betreffen seine Transaktivierungskapazität, also seine Fähigkeit, die Transkription seiner Zielgene zu induzieren oder zu unterdrücken bzw. ein verändertes Spektrum an Zielgenen zu kontrollieren, wodurch die Relevanz der Induktion von p53-Zielgenen als kritische Tumorsuppressorfunktion unterstrichen wird (60). Bisher wurde angenommen, dass die p53-vermittelte Transkription von p21 eine wichtige Rolle für die Induktion zellulärer Seneszenz spielt. Jedoch belegten Serrano und Kollegen, dass auch die p53-unabhängige Aktivierung von p21 zelluläre Seneszenz induzieren kann. p53-unabhängige Mechanismen der Seneszenz-Induktion sind besonders auf Grund der häufigen Mutationen von p53 in malignen Neoplasien von besonderem Interesse. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Aktivierung von p53 zur Inhibition von mTOR führt, jedoch auch in p53-defizienten Lymphomzellen Seneszenz durch Inhibition von mTOR induziert werden kann.

4.1 Aktivierung von p53 in bcl2-protectierten myc;p53^{ERTam}-Lymphomen induziert prämaturne Seneszenz

Zelluläre Seneszenz ist charakterisiert durch ein Zusammenspiel mehrerer Merkmale. Mittels Wachstumsanalysen, Zellzyklusanalysen und SA- β -Gal Färbung konnten klassische Merkmale von Seneszenz in Kontroll-Lymphomzellen, die für fünf Tage mit ADR behandelt wurden, gezeigt werden. Die Zellen weisen eine positive Anfärbbarkeit für die SA- β -Galactosidase auf, sie arretieren in der G1-Phase des Zellzyklus und es wurde ein deutlicher Wachstumsarrest beobachtet. In p53-defizienten Zellen lassen sich diese Marker der Seneszenz nach Behandlung mit ADR nicht darstellen. Interessanterweise führt jedoch die Aktivierung von p53 durch Tamoxifen im myc-transgenen Kontext in p53^{ERTam}-Lymphomen ohne Induktion eines weiteren DNA-Schadens, aber nicht die alleinige Gabe von Tamoxifen in Kontroll-Lymphomen, ebenfalls zu einem Wachstumsarrest mit allen Markern der prämaturnen Seneszenz. Christophorou und Kollegen erarbeiteten bereits in ihrem Trp53^{KI/KI}-Maus-Modell, dass nicht die Behandlung mit Tamoxifen alleine p53 aktiviert, sondern erst ein zusätzlicher DNA-Schaden die Effektorfunktionen des nun verfügbaren p53 bewirkt (122). Im E μ -myc-Mausmodell ist dementsprechend die Aktivität des Onkogens myc als entsprechender Trigger für die p53-Aktivierung über eine DNA-Schaden-Kaskade ursächlich. Die Wiederherstellung der p53-Funktion *in vitro* führte zur starken Induktion von bekannten p53-Zielgenen und auch Seneszenz-assoziierten Genen. Passend dazu konnten wir auch auf Proteinebene die Funktionalität von p53 zeigen. Sowohl das klassische p53-Zielgen PUMA, als auch der Seneszenz-Marker H3K9me3 wurden nach fünftägiger Behandlung mit Tamoxifen deutlich induziert. Die Effektivität der p53-Restauration als anti-Tumor-Mechanismus im E μ -myc-Mausmodell wurde erstmals von Martins beschrieben (123), wobei der Focus der Arbeit auf der Induktion von Apoptose lag. Unsere eigene Arbeitsgruppe konnte bereits vor einigen Jahren die Induktion von Seneszenz in E μ -myc;p53^{ERTam}- und bcl2-infizierten, also Apoptose-kompromittierten Lymphomzellen zeigen und die Ähnlichkeit zwischen TIS und Myc-OIS in diesem Modell aufzeigen (106). Dabei ist die durch kontinuierliches myc-Signaling bedingte Induktion von Seneszenz nach p53-Aktivierung (OIS) sicherlich nicht vergleichbar mit der OIS nach Überexpression eines Proto-Onkogens, wie bspw. RAS (146). Kritisch muss jedoch bemerkt werden, dass das System eine gewisse Durchlässigkeit („Leakyness“) der p53-Funktion aufweist. Im Rahmen der Tumorentstehung verlieren

die Lymphome, die in $E\mu$ -myc;p53^{KI/+}-Mäusen entstehen, durch LOH die Funktion ihres verbliebenen p53-Wildtyp-Allels. Sie sollten funktionell also vor Behandlung mit Tamoxifen p53null-Lymphomen entsprechen. Die Testung auf LOH erfolgte mittel PCR, wie im Methodenteil dargestellt. Behandelt man die p53^{ERTam/-}-Lymphomzellen analog den Kontroll-Lymphomen mit Adriamycin alleine oder mit Adriamycin und Tamoxifen parallel, so ist in beiden Behandlungsarmen eine vergleichbare Induktion der p53-Zielgene und der Seneszenz-assoziierten Gene zu verzeichnen (nicht gezeigte Daten). Vermutlich hat ADR auch einen freisetzenden Effekt auf die Heatshock-Bindung von p53^{ERTam}, wobei es jedoch dazu in der Literatur keine Belege gibt. Da nach Aktivierung von p53 eine ausgeprägte Veränderung im Genexpressionsprofil der untersuchten Lymphomzellen nachweisbar war, halten wir das Modell zur Untersuchung der Fragestellung trotzdem für geeignet.

4.2 Zellautonome und nicht zellautonome Funktionen von p53

Um die Relevanz von p53-Zielgenen in seneszenten Lymphomzellen einzuschätzen, untersuchten wir mit Hilfe von Gene Set Enrichment Analysen Microarray-ermittelte Genexpressionsprofile seneszenten Kontroll-Lymphome. Es wurde gezeigt, dass eine publizierte Liste von p53-Zielgenen (86) in seneszenten Lymphomzellen eine starke Anreicherung zeigte. Eine ähnlich starke Expression ergab sich für eine von uns mittels Literaturrecherche erstellte Liste von p53-Zielgenen und von Seneszenz-assoziierten Genen. Zur genaueren Quantifizierung untersuchten wir die Expression dieser Gene mittels Reverser-Transkriptase-quantitativer PCR. In Kontroll-Lymphomen wurden insgesamt 15 direkte p53-Zielgene sowie 19 der von uns untersuchten Seneszenz-assoziierten Gene signifikant differentiell reguliert. Erwähnenswert ist dabei, dass die meisten dieser Transkripte erst nach fünf Tagen nachweisbar waren, also nicht als akute Antwort auf einen DNA-Schaden interpretiert werden können, sondern in diesem zeitlichen Kontext wahrscheinlicher als spezifische Veränderungen im Rahmen der Induktion von Seneszenz gewertet werden müssen. Analog zu den bereits gezeigten fehlenden Markern prämaturer Seneszenz nach DNA-schädigender Therapie in p53-defizienten Zellen, zeigten sich auch auf der Ebene der Genexpression kaum Effekte, allenfalls eine Downregulation einiger weniger Gene. In Lymphomzellen mit regulierbarem p53 führte die Aktivierung von p53 sowohl akut (nach vier Stunden), aber

auch noch nach fünf Tagen zu einer starken Expression von p53-Zielgenen. Betrachtet man die untersuchten Genexpressionsprofile vergleichend, so sieht man eine große Schnittmenge von signifikant regulierten Genen in Kontroll-Lymphomen nach TIS und in p53^{ERTam}-Lymphomen nach Aktivierung von p53. Diese setzen sich zusammen aus Zellzyklusregulatoren (BTG family member 2, p21, Cyclin G1, p53-inducible gene 3), Zytokinen (Versican, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1, Thrombospondin 1, Matrixmetalloproteinase 2) und Apoptoseregulatoren (p53 upregulated modulator of apoptosis, Zinc finger protein SNAI2). Es wird aber auch die Expression von p53-Zielgenen angetrieben, welche den AKT- und den mTOR-Signalweg negativ regulieren. Hierbei handelt es sich um phlda3 und sestrin2. Auch REDD1 und fbxw7, ebenfalls mTOR-Inhibitoren, weisen in seneszenten Kontroll-Lymphomen eine verstärkte Expression auf.

Unter den Seneszenz-assoziierten Faktoren, welche nach Behandlung mit Adriamycin und p53-Aktivierung vermehrt transkribiert wurden, fanden sich zum einen das Gen für den Inhibitor of DNA binding 1 (ID-1), aber auch zahlreiche sekretierte Faktoren. Zu diesen gehören Zytokine wie IL-6, MCP1, Kit-Ligand, CXCL1 und CXCL5, aber auch ECM-Faktoren wie Biglycan, Decorin, Collagen-type I-alpha und Versican und ECM-modulierende Faktoren wie Thrombospondin 2, Matrixmetalloproteinase 3 und der connective tissue growth factor. Seneszente Zellen weisen ein massiv verändertes Transkriptom auf, wobei es weniger relevant zu sein scheint, ob es sich um replikative, onkogen-induzierte oder Therapie-induzierte Seneszenz handelt. Ein Großteil dieser Gene kodiert für sekretierte Faktoren wie Zytokine und Chemokine, auch zusammengefasst unter dem Namen SASP (74). Mit unserer Genexpressionsanalyse konnten wir sowohl unter den p53-Zielgenen, als auch unter den Seneszenz-assoziierten Genen, mehrere Faktoren des SASP identifizieren. Diese Zytokine und Faktoren der extrazellulären Matrix triggern eine Reihe von nicht-zellautonomen Effekten. Dem SASP wurden unter anderem proinflammatorische und promotogene Effekte zugeschrieben. So können seneszente Fibroblasten Amphiregulin und growth related oncogen (GRO) α (Cxcl1) sezernieren, die in Zellkulturen die Proliferation von prämaligen Epithelzellen stimulieren (147,148). Zudem stimulieren seneszente Fibroblasten, verglichen mit non-seneszenten Fibroblasten, prä maligne epitheliale Zellen, welche gewöhnlich keine Tumoren bilden, zur Formation maligner Tumoren *in vivo*, wenn beide subcutan ko-injiziert wurden (149).

Andererseits konnte aber auch gezeigt werden, dass seneszente Zellen über autokrine Mechanismen ihren seneszenten Arrest aufrechterhalten und sie sogar Nachbarzellen in Seneszenz versetzen können. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Signaltransduktion über den Il-8 Rezeptor (CXCR2) entscheidend zur Konsolidierung des onkogen-induzierten seneszenten Arrestes beiträgt (150). Dass auch in präneoplastischen Papillomen die Komponenten des SASP gefunden wurden, bestärkt diese Ergebnisse. Auch hier sind Komponenten des CXCR2-Netzwerkes hochreguliert (150). Es scheint also, als ob seneszente Zellen einerseits über die Etablierung eines proinflammatorischen Mikromilieus stimulierende Effekte auf das Tumorstadium ausüben, Seneszenz andererseits aber auch als zellautonomer Tumorsuppressormechanismus in prämaligen Läsionen agiert. Um hervorzuheben, dass viele dieser Faktoren neben ihrer Relevanz für Seneszenz auch mit kommunikativen Funktionen ausgestattet sind, nannten Kuilman und Peeper dieses Sekretom (SASP) auch „Seneszenz-Messaging-Sekretom“ (SMS) (151). Das SMS erzeugt ein komplexes Signalnetzwerk, in dem sekretierte Faktoren nicht nur die Zellen beeinflussen, die sie produzieren (autokrine Wirkung), sondern auch das Mikromilieu und damit die benachbarten Zellen (parakrine Wirkung). Die SMS-Faktoren können außerdem das angeborene Immunsystem stimulieren und den Abbau seneszenter Zellen bewirken (Daten der eigenen Arbeitsgruppe). Erwähnenswert ist noch die Beobachtung von Campisi und Kollegen, die eine Amplifikation und Akzeleration der SASP-Produktion in zuvor seneszenten, p53-defizienten, humanen Fibroblasten beobachteten (74). In ihrer Arbeit zeigte sie, dass der in humanen, seneszenten Zellen erzeugte SASP bestimmte maligne Phänotypen in kultivierten Zellen fördern kann - epithelial-mesenchymale Transition und Invasivität - und dass sowohl der SASP und der maligne Phänotyp durch p53-Hemmung noch verstärkt werden. Die funktionellen Konsequenzen des SASP sind komplex und durchaus uneinheitlich; es scheint, als ob der SASP je nach Zelltyp und Kontext entweder antiproliferative oder protumorigene Phänotypen fördern kann.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Form der Rapamycin-induzierten Seneszenz geht nicht einher mit der Produktion eines SASP. Laberge und Kollegen zeigten, dass Rapamycin den proinflammatorischen Phänotyp seneszenter Fibroblasten deutlich herabreguliert, indem es mit der IL1A-NF- κ B Feedback-Schleife interferiert. Dabei soll Rapamycin selektiv die Translation des SASP-relevanten Zytokins IL1A inhibieren,

wodurch die Etablierung der Signalkaskade verhindert wird, die NF- κ B und somit die Transkription von Genen für SASP Faktoren aktiviert. Damit einhergehend reduziert die Rapamycin-Behandlung seneszenter Fibroblasten deren Fähigkeit, das Wachstum von Prostatakarzinomzellen zu stimulieren (152). Somit ergeben sich neben der in dieser Arbeit beobachteten Induktion von Seneszenz durch Behandlung mit Rapamycin weitere Implikationen für einen rationalen Einsatz von mTOR-Inhibitoren in der Klinik. Insbesondere unter den p53-Zielgenen fanden sich auch eine Reihe von Komponenten intrazellulärer Signalwege in seneszenten Zellen signifikant reguliert. Die zentrale Funktion von p53 ist es, Zellen, die genetische Schäden aufweisen, an der weiteren Proliferation zu hindern. Dementsprechend fanden wir auch mehrere Zellzyklusregulatoren (p21, BTG2, Cyclin G1, PIG3) und Apoptoseregulatoren (PUMA, SNAI2) in unserer Analyse. Der bekannteste Zellzyklusregulator ist sicherlich p21. p21 hemmt sowohl den Cyclin D/CDK4/6-Komplex als auch den Cyclin E/CDK2-Komplex. p21 ist für die Induktion von Seneszenz jedoch nicht zwingend notwendig. So konnte gezeigt werden, dass p21-defiziente Zellen in der Lage sind, einen seneszenten Phänotyp auszubilden (21). Auch für BTG2 (B-cell translocation gene 2) wurde bereits eine Rolle in der (replikativen) Seneszenz beschrieben. In humanen Fibroblasten führte der Verlust von BTG2 zu einer verlängerten Passagezahl und die Überexpression von BTG2 induzierte Seneszenz, bemerkenswerterweise unabhängig von p53 (153). Cyclin G1 wird eine Funktion im G2/M-Checkpoint zugeschrieben (154). Eine andere Arbeitsgruppe fand jedoch vielmehr eine Interaktion von Cyclin G1 mit ARF, Mdm2 und p53 und einem über diesen Signalweg induzierten G1-Phase-Arrest (130). Insgesamt ist jedoch die Funktion dieses Gens und seines Proteins bisher schlecht charakterisiert. Das p53-inducible gene 3 (PIG3) wurde als entscheidender Akteur im DNA-Damage-Signalweg beschrieben und ist an der Weiterleitung des Signals nach einem DNA-Schaden an den S- und G2/M-Checkpoint beteiligt (155). Außerdem fanden wir zwei proapoptotische Gene nach fünftägiger Behandlung mit Adriamycin signifikant reguliert, PUMA und Slug (SNAI2). PUMA, auch Bcl2-binding component 3 (BBC3), ist ein proapoptotisches Protein und gehört zur Bcl-2 Proteinfamilie (156). Slug (SNAI2) ist ein Transkriptionsrepressor und gehört zu der snail-Familie der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren. Slug schützt geschädigte Zellen vor Apoptose, indem es die p53-induzierte Transkription von PUMA inhibiert (157). Es verwundert nicht, dass wir nach Induktion eines DNA-Schadens die Hochregulation des Apoptose fördernden

Gens PUMA beobachten, bzw. dieses bona fide p53-Zielgen nach p53-Aktivierung positiv reguliert wird. Interessant ist aber die gleichzeitige Expression des Gens Slug, welches wiederum die Expression von PUMA hemmt, so dass hier ein gutes Beispiel der zellulären Homöostase sichtbar wird. Es hängt von vielen weiteren Faktoren ab, ob p53 Apoptose auslöst, oder über Wachstumsarrest und Seneszenz das Überleben einer Zelle fördert.

Letztendlich bleiben noch *sestrin2* und *phlda3* zu betrachten. Beide bewirken eine Aktivierung von TSC2 und somit eine Inhibition von mTOR.

4.3 p53-abhängige Expression von Inhibitoren des mTOR-Signalweges

Tumorzellen aktivieren häufig die MAPK und PI3K/AKT für die Proliferation und das Wachstum. In Seneszenz werden Proliferationssignale durch die p53-abhängige Aktivierung von Zellzyklusregulatoren wie p21 unterbrochen. Wie das Zellwachstum, also die Endstrecke der PI3K/AKT-Kaskade reguliert wird, ist bisher jedoch weniger gut untersucht. Auch hier scheinen p53-abhängige Gene wie *phlda3* und *sestrin2* eine entscheidende Rolle zu spielen. mTOR (mammalian target of Rapamycin) ist eine von der Hefe bis zum Menschen funktionell konservierte Serin/Threonin-Kinase mit zahlreichen Funktionen in der Zelle. Insbesondere koordiniert es die Steuerung von Zellwachstum und -proliferation. Dabei wird zwischen zwei funktionellen mTOR-Subkomplexen differenziert. Zum einen kennt man den Rapamycin-sensitiven Komplex mTORC1, in dem die Kinase mTOR einen Komplex mit den Proteinen Raptor und FKBP12 eingeht. Zum anderen ist der Rapamycin-insensitive mTORC2-Komplex definiert, in welchem mTOR in einen Komplex mit Rictor und mLST8 vorliegt (158). mTORC1 reguliert die Translation wachstumsfördernder Gene in der Zelle als Reaktion auf Signalwege, die durch Wachstumsfaktoren, Nährstoffe, den Energiestatus oder Stress stimuliert werden (159). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das p53-Protein die Expression von Genen induziert, die über verschiedene Signalwege die Aktivität von mTOR mindern. Sowohl *sestrin2*, als auch *phlda3* werden nach Induktion von TIS oder OIS verstärkt transkribiert. Dies zeigt sich bereits im Microarray sehr konsistent in allen Proben und ließ sich mittels RQ-PCR bestätigen. *Sestrin2* ist ein Aktivator von AMPK α , *phlda3* ein Repressor des AKT-Proteins. Mittels Western Blot

Analysen von seneszenten Kontroll-Lymphomen konnte die Funktionalität der beschriebenen Signalwege auch auf Proteinebene gezeigt werden. AKT stellt sich in seneszenten Zellen vermindert phosphoryliert und damit inaktiv dar, AMPK α liegt in seiner aktiven, phosphorylierten Form vor. Beide Signalwege führen zu einer Inhibierung der mTOR-Funktion. Das direkte downstream target von mTOR ist die p70S6-Kinase. Der Phosphorylierungsstatus der p70S6-Kinase (Thr-389) wird üblicherweise als funktioneller Assay der mTOR-Aktivität genutzt. Entsprechend einer verringerten mTOR- Aktivität lag auch p70S6K in seneszenten Lymphomzellen hypophosphoryliert, also inaktiv vor. Des Weiteren ist bekannt, dass die Inhibition von mTOR Autophagie auslösen kann. Neben der Phosphorylierung der p70S6-Kinase wurde auch die Induktion von Autophagie als Surrogat für eine verminderte mTOR-Funktion untersucht. Sowohl nach Behandlung der Lymphomzellen mit Adriamycin (160), als auch nach Behandlung mit Rapamycin konnte eine Konversion von LC3-I zu LC3-II beobachtet werden, welche als Indiz für Autophagie gilt. Die Signifikanz der Induktion von Autophagie für zelluläre Seneszenz wurde unter anderem durch Young und Kollegen untersucht (137). Der zentrale Regulator von mTORC1 ist der TSC1-TSC2-Komplex. Dieser wird aus den Proteinen TSC1 (Hamartin) und TSC2 (Tuberin) gebildet und erfüllt als Komplex seine regulatorische Funktion durch die Aktivierung der GTPase Rheb (161). Eine Fehlfunktion dieser Signalwege kann in Zellen und Geweben zu Defekten und Krankheiten führen. Tuberöse Sklerose z.B. wird durch inaktivierende Mutationen im Gen von TSC1 bzw. TSC2 ausgelöst (162). Dieses seltene Krankheitsbild ist eine genetische Multiorgan-Erkrankung, die mit Fehlbildungen und Tumoren des Gehirns, Hautveränderungen, Angiofibromen und gutartigen Tumoren in anderen Organen einhergeht.

Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Unterbrechung des beschriebenen Signalweges durch Inhibition des mTOR-Regulators TSC2 mittels sh-RNA zu einem partiellen Verlust des seneszenten Phänotyps nach DNA-schädigender Therapie führt. Die Fraktion der G1-arretierten Zellen lag bei den untersuchten Lymphomen niedriger, als bei Kontroll-Lymphomen, die S-Phase Reduktion fiel geringer aus. Dabei ist zu erwähnen, dass in einigen Lymphomen sogar eine erhaltenen S-Phase und ein kompletter Verlust der SA- β -Gal-Positivität zu verzeichnen war. Dies mag bedingt sein durch unterschiedlich starke Expression der short-hairpin Sonde in den individuellen Lymphomen oder aber durch verschiedenste Interaktionen mit weiteren Signalwegen,

die interindividuell different aktiv sind. Adriamycin aktiviert p53 über einen DNA-Damage-Signalweg, was wiederum zu Induktion einer großen Anzahl von p53-Zielgenen führt. So ist es nicht verwunderlich, dass die Unterbrechung dieses einen untersuchten Signalweges nicht zu einer kompletten Aufhebung der prämaternen Seneszenz in Lymphomzellen führt. Es ist in den sh-TSC2 infizierten Lymphomzellen also eher von einem partiellen Seneszenz-Defekt, als von einem Seneszenz-Verlust auszugehen.

Insgesamt passen die dargestellten Untersuchungen zu den in den letzten Jahren zunehmenden Veröffentlichungen, die eine enge Verknüpfung des p53- und des mTOR- Signalweges beschreiben (110,163,164). Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen eine p53-verursachte Hemmung des mTOR-Signalwegs, die nicht nur – wie bereits gezeigt - Autophagie bedingt, sondern auch wie im Folgenden dargestellt zur Induktion von Seneszenz führt. Da in unserem Modell der Rapamycin induzierten Seneszenz eine deutlich Konversion von LC3-I zu LC3-II nachweisbar war, kann spekuliert werden, ob Rapamycin zumindest teilweise über die Induktion von Autophagie einen seneszenten Arrest in den untersuchten Lymphomzellen auslöst. Weiterführende Experimente sollten in atg5-/-, also Autophagie-kompromittierten Zellen untersuchen, ob ein Seneszenz-Defekt (insbesondere Rapamycin-induzierte Seneszenz) in diesen Zellen vorliegt.

4.4 Induktion von Seneszenz downstream von p53 – ein neues pharmakologisches Prinzip

Die pathophysiologisch relevante Aktivierung von mTOR und seinen Signalwegen in Lymphomen ist vielfach beschrieben (165–168). So konnten Xu und Kollegen an einem Kollektiv von 73 Patienten mit einem DLBCL eine Aktivierung von AKT und mTOR in 54.8% bzw. 46.6% der Erkrankten zeigen (169). Die Aufklärung dieses Signalwegs in Krebszellen ist nicht nur interessant, sondern hat auch eine Bedeutung für die Arzneimittelentwicklung der mTOR-Inhibitoren.

Da insbesondere die Induktion von Seneszenz downstream von p53 ein interessantes pharmakologisches Prinzip darstellt, wurden verschiedene Substanzen genutzt, die den oben beschriebenen Signalweg beeinflussen. Die pharmakologische Aktivierung von AMPK α mittels Metformin und die Inhibition von AKT mittels AKT-Inhibitor führten zu

einem stabilen Arrest der untersuchten Lymphomzellen. Sowohl Metformin, als auch der AKT- Inhibitor verlangsamten das Zellwachstum, aber nur die Doppelbehandlung ging mit einem stabilen, Seneszenz-Marker-positiven Wachstumsarrest einher. Beide Inhibitoren wurden in subtoxischen Dosen eingesetzt, so dass kein relevanter Zelltod ausgelöst wurde. Berichte über die antiproliferative Wirksamkeit von Metformin haben sich in den vergangenen Jahren gemehrt. In einer 2011 veröffentlichten Metaanalyse über fünf Studien mit insgesamt 108.161 Typ-2-Diabetikern führte die Behandlung mit Metformin zu einem deutlich verminderten Risiko für die Entstehung von kolorektalen Karzinomen (170). Ähnliche Beobachtungen wurden an Patienten mit Mammakarzinom, Pankreaskarzinom und vielen weiteren Entitäten gemacht (171,172). Shi und Kollegen demonstrierten eine Inaktivierung von AMPK α und eine Überaktivierung des mTOR-Signalweges in humanen Lymphomen. Außerdem gelang es Ihnen, eine AMPK α -abhängige antiproliferative Wirkung von Metformin zu beweisen, die in Kombination mit Adriamycin oder Temsirolimus Autophagie auslöste (144). In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls der antiproliferative Effekt über die Aktivierung von AMPK α dargestellt werden, wobei jedoch erst die Kombinationsbehandlung mit einem AKT-Inhibitor zu einem echten Wachstumsarrest und Seneszenz-Induktion in p53-profizienten und p53-defizienten Lymphomen führte. Auch PI3Kinase-Inhibitoren und AKT-Inhibitoren befinden sich mittlerweile in zahlreichen klinischen Studien. So gilt Idelalisib, ein Inhibitor von Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) Delta als vielversprechendes neues Therapeutikum für B-Non-Hodgkin-Lymphome (173). Insgesamt wird die Relevanz des in dieser Arbeit beschriebenen Signalweges in vielen Untersuchungen deutlich. Durch die erhobenen Daten gelingt es hier eine Verknüpfung des p53-Signalweges mit dem mTOR-Signalweg aufzuzeigen. Die gemeinsame Endstrecke liegt bei unseren Beobachtungen in Apoptose-kompromittierten Lymphomen in der Induktion von prämaturer Seneszenz. Somit konnte ein weiterer Mechanismus der antineoplastischen Wirksamkeit der oben genannten Medikamente, insbesondere wenn in Kombination eingesetzt, postuliert werden.

Auch die pharmakologische Inhibition von mTOR ist eine bereits in der Klinik eingesetzte Therapiemodalität. Es war dementsprechend von besonderem Interesse herauszufinden, ob auch die Inhibition von mTOR in apoptosedefekten Lymphomzellen den „Tumor failsafe“ Mechanismus Seneszenz induziert. Wie gezeigt werden konnte,

arretieren Lymphomzellen nach Behandlung mit Rapamycin über viele Tage stabil, sie weisen einen SA- β -Gal-assoziierten Phänotyp und einen S-Phase Verlust mit massiver Akkumulation von Zellen in der G1-Phase auf. Des Weiteren konnten wir die Regulation Seneszenz-typischer Merkmale wie die Hypophosphorylierung von Rb und die Induktion von p21 beobachten. Ich postuliere daher, dass Rapamycin in Lymphomzellen Seneszenz induzieren kann. Ähnliche Beobachtungen machten Chatterjee und Kollegen. Nach Behandlung der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 mit Rapamycin in mikromolaren Dosen detektierten sie einen G1-Arrest und hypophosphoryliertes Rb (174). Da die Hemmung von mTOR in dem beschriebenen Signalweg downstream von p53 angreift, sollte auch die Hemmung von mTOR in p53-defizienten Zellen zu einem seneszenten Arrest führen. Wie erwartet konnte nach Behandlung mit Rapamycin auch in p53-defizienten Lymphomen eine massive Reduktion der Proliferationskapazität und eine SA- β -Gal Positivität beobachtet werden. Des Weiteren zeigte die Zellzyklusanalyse einen partiellen Verlust der S-Phase. Damit entspricht der beobachtete Wachstumsarrest formal den üblichen Kriterien der Seneszenz. Inwieweit das stark reduzierte, aber nicht aufgehobene Wachstumsverhalten und die S-Phase-Reduktion in Rapamycin-exponierten p53-defizienten Zellen eine insensitive Subpopulation oder eine insgesamt weniger robuste bzw. „tiefe“ Form zellulärer Seneszenz darstellt bleibt noch offen. Möglicherweise beobachten wir eine „Slow-Onset Senescence“ in zunächst nur einem Teil der Zellen oder eine Sonderform von Seneszenz, die nicht alle typischen Merkmale klassischer Seneszenz gleichermaßen konsistent aufweist – und damit womöglich auch funktionell nur eine „Senescence light“ darstellt. Dafür sprechen würde auch der ausbleibende SASP. Diese Frage müssen weiterführende Untersuchungen klären.

Auch proteinanalytisch konnte die Regulation Seneszenz-typischer Proteine nachgewiesen werden. Erwähnenswert ist auch hier das Vorliegen von hypophosphoryliertem Rb nach Behandlung mit Rapamycin, was erneut unterstreicht, dass es sich um eine p53-unabhängige Seneszenz-Induktion handelt. Passend zu unseren Untersuchungen wurden auch Berichte über einen lebensverlängernden Effekt von Rapamycin in p53null Mäusen veröffentlicht (175). In non-small cell lung cancer (NSCLC) Zelllinien wurde in Kombination mit Bestrahlung ein negativer Effekt auf das Zellwachstum (G1-Arrest) unabhängig vom p53 Status beobachtet (176).

Das Zusammenspiel von p53 und mTOR ist jedoch viel komplexer. Aktuelle Studien beschreiben eine duale Funktion für p53, indem es zwischen Quieszenz und Seneszenz mittels mTOR unterscheidet. Die paradoxe Funktion von p53, dass auf der einen Seite Seneszenz unterdrückt durch Förderung von Quieszenz, und auf der anderen Seite Seneszenz induziert, wurde von M. Blagosklonny und Kollegen untersucht (177,178). Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen beschreiben die Kollegen eine Induktion von Seneszenz in quieszenten humanen Fibroblasten durch knock-down von TSC2. In der Literatur findet sich aktuell ein sehr heterogenes Bild an Beschreibungen über das Zusammenspiel von p53 und mTOR und deren Rolle in der prämaternen Seneszenz. Die bisherigen Beobachtungen sind sicherlich stark abhängig von Kontext und Zelltyp. Zumindest in Lymphomzellen scheint die Inhibition von mTOR jedoch entscheidenden Einfluss auf die Induktion von Seneszenz zu haben. Unsere Beobachtungen werden unterstützt durch Experimente von Wall und Kollegen, die eine Seneszenz-Induktion in Everolimus-behandelten Mäusen mit E μ -myc-Lymphomen nachweisen konnten (179). Zusammenfassend ist insbesondere zu erwähnen, dass die Behandlung mit Rapamycin auch in den „Seneszenz-defekten“, sh-TSC2-exprimierenden Lymphomzellen und in p53null-Lymphomzellen zu einem stabilen Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus führt, der mit einer Positivität von SA- β -Gal einherging. Rapamycin ist also auch bei Defekten im Signalweg upstream von mTOR wirksam.

mTOR-Inhibitoren werden bereits klinisch eingesetzt und es konnten vielversprechende Resultate erzielt werden. Da jedoch Resistenzentwicklungen ein Problem darstellen, ist die genaue Erforschung der beteiligten Signalwege von immenser Wichtigkeit, da es den sinnvollen Einsatz von Kombinations- oder erneut wirksamen Folgetherapien ermöglicht. Der von uns beschriebene Mechanismus der Seneszenz-Induktion über verschiedene Komponenten des mTOR-Signalweges bietet einen Lösungsansatz zum Verständnis der beteiligten Mechanismen und des therapeutischen Potentials der eingesetzten Substanzen, im speziellen des AMPK α -Aktivators Metformin und des AKT-Inhibitors Triciribine in Kombination oder sequentiell bei klinischer Rapamycin-Insensitivität.

4.5 Die Inhibition des mTOR-Signalweges führt zu einer effektiven Antitumor-Aktivität

Rapamycin (Sirolimus), ein natürlicher mTOR-Inhibitor, der im Rahmen eines Programms zur Identifikation vorhandener biologischer Substanzen bereits in den 70er Jahren identifiziert wurde, stellt die Ausgangssubstanz der heute klinisch benutzten mTOR-Inhibitoren dar (Temsirolimus, Everolimus, Ridaforolimus – sog. „Rapalogs“), die eine chemische Modifikation von Rapamycin darstellen. Zahlreiche klinische Studien haben die Wirksamkeit von mTOR-Inhibitoren in der Therapie verschiedenster Tumorentitäten belegt. Aktuell werden mTOR-Inhibitoren unter anderem eingesetzt in der Behandlung des Nierenzellkarzinoms, des Mammakarzinoms und der neuroendokrinen Tumore.

Um die mit prämaturer Seneszenz einhergehende Antitumoraktivität der mTOR-Inhibition in unserem Lymphom-Modell *in vivo* zu bestätigen, wurden Lymphomtragende Mäuse mit Rapamycin behandelt. Dabei konnten eine mediane Verlängerung des Überlebens um 14 Tage beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von R. Johnstone. Die Kollegen beobachteten eine signifikante, wenn auch weniger ausgeprägte, Überlebensverlängerung nach Behandlung mit Everolimus (179). Entscheidend war nun die Frage, ob die Behandlung mit Rapamycin in diesen Apoptose-defekten Lymphomen Seneszenz induzierte und somit Seneszenz zum längeren Überleben der Mäuse beitrug. Wie gezeigt werden konnte, wiesen die Lymphknoten der behandelten Mäuse in der SA- β -Galactosidase Färbung deutlich mehr positive Zellen im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten Kontrollen auf. Da *in vitro* auch in p53-defizienten Lymphomen Seneszenz durch Rapamycin induziert wurde, fragten wir, ob Rapamycin *in vivo* ebenfalls eine effektive Behandlung für p53-defiziente Lymphome darstellt. Wie erwartet, wurde eine signifikante Verlängerung des medianen Überlebens auf 32 Tage im Vergleich zu Vehikel (3 Tage) beobachtet. Bemerkenswerterweise ist der Unterschied im medianen Überleben der Kontroll-Lymphome verglichen mit den p53-defizienten Lymphomen nach Behandlung mit Rapamycin statistisch nicht signifikant; somit zeigt Rapamycin eine gleichwertige Wirksamkeit in einem Tumorgenotyp, der unter konventioneller Chemotherapie in der Klinik und im Mausmodell bekanntermaßen stets nur inferiore Outcomes erzielt (55,94). Dieses Ergebnis ist insbesondere erwähnenswert, weil Wall und Kollegen bei Mäusen, die mit *myc;p53null* (ohne *bcl-2* Überexpression)

Lymphomen transplantiert wurden, durch Behandlung mit Everolimus kein verlängertes Überleben beobachten konnten. Dabei könnte der nicht identische Wirkmechanismus beider Substanzen eine Rolle spielen. Auf molekularer Ebene binden Rapamycin und Everolimus an das gleiche Zielenzym, das FK506-Bindeprotein-12 (FKBP12), im Zytoplasma (180,181). Die Wasserlöslichkeit und orale Bioverfügbarkeit von Everolimus ist höher als die von Rapamycin, die Aktivität *in vitro* jedoch geringer. Sowohl Everolimus, als auch Rapamycin unterliegen einem ausgeprägten intestinalen first-pass-Effekt, so dass auch der Applikationsmechanismus die Wirksamkeit beeinflussen könnte. Im Vergleich zu Wall und Kollegen, welche Everolimus oral verabreicht haben, wurde das Rapamycin in unserem Experiment intraperitoneal gespritzt.

Auch in der Klinik konnten mTOR-Inhibitoren ihre Monoeffektivität nachweisen, so ist beispielsweise Temsirolimus für die Therapie des rezidivierten/refraktären Mantelzelllymphoms (MCL) zugelassen. Die Rationale für die Wirksamkeit von Temsirolimus beim fortgeschrittenen Mantelzell-Lymphom ergibt sich durch dessen Pathophysiologie. Das MCL ist durch die Chromosomentranslokation t(11;14) q(13;32) gekennzeichnet, die zu einer Überexpression von Cyclin D1 führt, einem zentralen Protein der Zellzyklusprogression. Dieses ist von mTOR abhängig. Durch den Einsatz von Temsirolimus wird mTOR inhibiert und dadurch weniger Cyclin D1 produziert. Die tatsächliche Datenlage zu diesem molekularen Erklärungsansatz ist jedoch dünn. Umso mehr suggerieren die in der Arbeit erhobenen Daten eine Cyclin D1-unabhängige Effizienz-Erklärung für die mTOR-Blockade beim Mantelzelllymphom.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten über die Funktion von mTOR in der Tumorthherapie lassen jedoch auch eine begründete Spekulation über den Einsatz von mTOR-Inhibitoren in weiteren Lymphom-Entitäten zu. Aktuell rekrutieren verschiedenste klinische Studien Patienten zur Testung von mTOR-Inhibitoren in der Lymphom-Therapie. So wird zum Beispiel Rituximab in Kombination mit Everolimus in der Erhaltungstherapie bei CD20+ B-Zell-Lymphomen (Mantelzelllymphom, Low-Grade-B-Zell-Lymphomen (SLL/CLL), transformierten Lymphomen, DLBCL, PMBCL und Hodgkin-Lymphomen untersucht (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01665768). Weitere Studien testeten den Einsatz von Everolimus in Kombination mit Rituximab in der Therapie des rezidivierten oder refraktären DLBCL (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00869999), sowie die Kombinationstherapie von R-CHOP und Everolimus bei

neudiagnostiziertem und nicht vorbehandeltem DLBCL (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01334502).

Neben den vielversprechenden klinischen Ergebnissen muss jedoch auch die Möglichkeit einer raschen Resistenzentwicklung betrachtet werden. Trotz signifikanter Verlängerung des medianen Überlebens in Kontroll-Lymphomen und in p53-defizienten Lymphomen, verstarben die behandelten Mäuse rasch. Dabei ist der *in vivo*-Reprogress jedoch nicht notwendigerweise auf eine Resistenzentwicklung zurückzuführen, sondern alternativ auf mangelnde Rapamycin-Exposition einzelner Zellen. Obwohl die Anti-Tumor-Wirkungen von Rapamycin gut dokumentiert ist, stellt das Phänomen der Rapamycin-Resistenz ein charakteristisches Merkmal der Substanz dar (180,182,183). Die mTORC1/S6K-Achse vermittelt negative Rückkopplungsschleifen, die u.a. Signalwege durch Insulin/IGF-Rezeptor und andere Tyrosinkinase-Rezeptoren dämpfen. Die Unterdrückung dieser Rückkopplungsschleifen durch Inhibition von mTOR kann dementsprechend zu einer Überaktivierung dieser Upstream-Wege führen und bildet somit möglicherweise ein Gegengewicht zu den antiproliferativen Wirkungen von mTOR-Inhibitoren. So konnte eine IGF-1R-abhängige feedback Aktivierung von AKT durch Inhibition von mTOR gezeigt werden, die dann auch zur verstärkten Inaktivierung von – tumorsuppressiven - FoxO-Familienmitgliedern führt (184,185). Ebenso wurden die feedback-Aktivierung von ERK 1/2 und erhöhte Level von phosphoryliertem Bad in Rapamycin-resistenten Lungenkarzinom-Zelllinien beschrieben (186,187). Wenn Bad (Bcl-2-Antagonist of Cell Death) phosphoryliert wird, kann es das antiapoptotische bcl-XL nicht mehr binden und führt damit zu einer Apoptose-Resistenz der Zellen. Diese Resistenzmechanismen betreffen vor allem die Therapie mit direkten Inhibitoren von mTOR.

Auf Basis dieser Beobachtungen generierten wir Rapamycin-resistente Lymphome und behandelten diese mit Metformin und dem AKT-Inhibitor Triciribine. In p53-defizienten Lymphomen zeigte die Behandlung mit Metformin nur einen geringen Effekt, Triciribine und die Kombinationsbehandlung mit beiden Substanzen induzierte jedoch einen G1-Arrest, wobei eine höhere Dosierung als in Rapamycin sensitiven Lymphomen erforderlich war. Diese Beobachtung lässt in p53-defizienten Lymphomen eine enge Verknüpfung von p53 mit dem AKT-Signalweg vermuten. Der p53-Verlust in Kombination mit der Rapamycin-Resistenz führt wahrscheinlich zu einer Aktivierung/Sensibilisierung des AKT-Signalweges mit einem konsekutiven Ansprechen

auf dessen Inhibition. Entsprechend dieses Modells zeigten Wang und Kollegen in epithelialen, p53-defizienten Zelllinien eine verminderte PTEN-Expression mit konsekutiver vermehrter AKT Aktivierung nach UV-Bestrahlung (188). Die konstitutive Überexpression des myc Onkogens in den verwendeten Lymphomzellen könnte als ähnlicher Trigger wirken. Konsekutiv sollte in Mausexperimenten die Validität dieses Mechanismus auch *in vivo* untersucht werden.

Das Verständnis des molekularen Wirkmechanismus der mTOR-Inhibitoren wird wichtig sein, um deren Effektivität zu steigern, Resistenzentwicklung entgegenzuwirken oder eingetretene Insensitivität pharmakologisch zu überwinden. Mit der vorliegenden Arbeit konnte die Vernetzung des p53-Signalwegs mit dem mTOR-Signalweg sowie der pro-seneszente Effekt der mTOR-Inhibition in p53-profizienten und p53-defizienten Lymphomzellen dargelegt werden.

4.6 Limitationen und Perspektiven

Es bleibt anzumerken, dass das für diese Arbeit gewählte methodische Vorgehen (Analyse der Genexpression anhand einer durch Literaturrecherche erstellten Liste) rückblickend optimiert werden könnte. Es wäre sicherlich sinnvoll gewesen, zusätzlich Microarray Daten, möglicherweise in Kopplung mit ChIP-Seq- bzw. ChIP-on-chip-Daten, von p53^{ERTam}-Lymphomen zu erstellen um einen noch umfassenderen Eindruck über die überlappenden Genexpressionsprofile zu erhalten. Bei dem von uns gewählten Vorgehen bleibt eine Restunsicherheit, entscheidende Gene zu übersehen, da sie in unserer a priori erstellten Liste nicht enthalten sind. Zudem wäre auch die Analyse der Genexpression im längeren zeitlichen Verlauf, z.B. nach 10 Tagen, ein interessanter Aspekt, da somit auch Gene der Seneszenz-Aufrechterhaltung untersucht würden.

Auch die methodische Optimierung des Experimentes der Seneszenz-Untersuchungen in sh-TSC2-infizierten Lymphomzellen würde sicherlich eindeutiger Ergebnisse ermöglichen. Zwar wurde die knock-down Effizienz der Sonde untersucht, mit sehr gutem Ergebnis, jedoch lässt die starke Schwankungsbreite der Seneszenz-Inhibition, sowohl im BrdU/PI-Assay, als auch in der SA- β -Gal Färbung vermuten, dass der knock-down in den individuellen Lymphomen verschieden stark ausgeprägt war. Die Untersuchung der Effizienz in jedem einzelnen Lymphom nach Infektion wäre hier sicherlich hilfreich.

Eine der dringendsten Fragen die sich aus dieser Arbeit ergibt, betrifft die ausgeprägte Induktion eines SASP in TIS und OIS in p53-kompetenten Zellen, jedoch das verminderte SASP in Rapamycin-induzierter Seneszenz (passend zur gehemmten Translation der SASP-Transkripte). Wie erklärt sich nun die starke SASP-Produktion in p53-aktiven und somit mTOR-reprimierten seneszenten Zellen? Wäre das SASP durch eine Aktivierung von mTOR sogar noch stärker ausgeprägt? Da wir wissen, dass viele Faktoren des SASP NF- κ B reguliert exprimiert werden, verlangt es nach experimenteller Untersuchung bspw. in NF- κ B-Superrepressor-transduzierten Zellen. Es bleibt in der vorliegenden Arbeit leider offen, ob mTOR wichtiger positiver/negativer Regulator der SASP-Expression (d.h. SASP-Translation) ist, und/oder welche alternativen bzw. interferierenden Signalkaskaden mTOR-unabhängig SASP-Expression treiben (bspw. DNA-Schädigung \rightarrow ATM \rightarrow NF- κ B \rightarrow SASP).

Da die Rapamycin-induzierte Seneszenz scheinbar eine Sonderform der Seneszenz mit entscheidend unterschiedlichen Merkmalen als TIS und OIS darstellt, müssen zur näheren Charakterisierung dieses Seneszenz-Phänotyps auch weitere Seneszenz-Merkmale untersucht werden. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass in Rapamycin-seneszenten Zellen kein hypermetaboler Phänotyp vorliegt (160). Somit sollten weitere metabolische Implikationen von mTOR-Inhibitoren untersucht werden. Ebenso interessant ist der Einfluss von p53-Mutationen im Gegensatz zu biallelen p53-Deletionen auf die Wirkung von Rapamycin.

Die Arbeit beschränkt sich die größtenteils auf pharmakologische Modulationen des mTOR-Signalweges. Unabdingbar zur genetischen Verifizierung der besprochenen Signalkaskade ist ein Experiment der simultanen Überexpression von sestrin2 und phlda3 mit konsekutiven Untersuchungen zur Seneszenz-Induktion.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob der Mechanismus der Rapamycin-induzierten Seneszenz auf andere Entitäten übertragbar ist. So sollten bspw. Zelllinien verschiedenster Tumoren mit- und ohne intaktes p53 untersucht werden.

Da in dem vorliegenden Modell der Rapamycin-induzierten Seneszenz eine deutlich Konversion von LC3-I zu LC3-II nachweisbar war, kann spekuliert werden, ob Rapamycin zumindest teilweise über die Induktion von Autophagie einen seneszenten Arrest in den untersuchten Lymphomzellen auslöst. Weiterführende Experimente sollten in atg5^{-/-}, also Autophagie kompromittierten Zellen untersuchen, ob ein Seneszenz-Defekt (insbesondere Rapamycin induzierte Seneszenz) in diesen Zellen vorliegt.

Nicht zuletzt ist die klinische Relevanz der erhobenen Untersuchungen interessant. Wie *in vitro* gezeigt und auch diskutiert, bedeutet eine Rapamycin-Resistenz nicht zwingend, dass upstream von mTOR gelegene pharmakologische Inhibitoren auch ihre Wirkung verlieren. Somit sollte ein Mausexperiment den kombinierten Einsatz von Metformin und Triciribine in Rapamycin-resistenten p53-profizienten und p53-defizienten Lymphomen untersuchen.

5 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abbildung 1.1	Mechanismen der Induktion zellulärer Seneszenz.....	14
Abbildung 1.2	Proliferierende und seneszente murine Lymphomzellen nach SA- β -Gal Färbung.....	15
Abbildung 1.3	Biomarker der zellulären Seneszenz	16
Abbildung 1.4	Verschiedenste Signale führen zur Aktivierung Seneszenz-induzierender Signalkaskaden.....	20
Abbildung 1.5	Das p53-Netzwerk.....	25
Abbildung 1.6	p53-Signalwege der Tumorsuppression.....	28
Abbildung 1.7	Darstellung des PI3K – AKT – mTOR – Signalwegs.....	33
Abbildung 2.1	Das p53-Knockout-Konstrukt.....	50
Abbildung 2.2	Mechanismus der Regulation von Fusionsproteinen.....	51
Abbildung 2.3	Rapamycin-resistente Lymphome.....	54
Abbildung 2.4	p53-LOH Genotypisierungs- PCR.....	59
Abbildung 2.5	p53 ^{ERTam} -Genotypisierungs- PCR.....	59
Abbildung 2.6	Aufbau eines Western Blots.....	70
Abbildung 3.1	Induktion von TIS und OIS.....	73
Abbildung 3.2	Wachstumsverhalten von Kontroll-Lymphomen und p53-defizienten Lymphomen nach Behandlung mit ADR.....	74
Abbildung 3.3	SA- β -Gal Aktivität in Kontroll-Lymphomen und p53-defizienten Lymphomen nach 5fünf Tagen Behandlung mit ADR.....	75
Abbildung 3.4	Wachstumsverhalten der p53 ^{ERTam} -Lymphomzellen nach Behandlung mit Tamoxifen.....	76
Abbildung 3.5	BrdU/PI-Färbung der mit 4-OHT behandelten p53 ^{ERTam} -Lymphomzellen.....	76
Abbildung 3.6	Tamoxifen-induzierte Seneszenz.....	77
Abbildung 3.7	Immunoblot des an p53 gekoppelten Östrogenrezeptors.....	78
Abbildung 3.8	Immunoblot von myc;p53 ^{ERTam} -Lymphomzellen, die mit EtOH, 4h, 1d oder 5d 4-OHT behandelt wurden.....	78

Abbildung 3.9	Induktion von p53-Zielgenen in seneszenten Lymphomzellen.....	80
Abbildung 3.10	Induktion Seneszenz-assoziiierter Gene in seneszenten Lymphomzellen.	81
Abbildung 3.11	Induktion von p53-Zielgenen in Lymphomzellen 24 Stunden nach Behandlung mit ADR.....	82
Abbildung 3.12	Induktion von p53-Zielgenen in Seneszenz-kompromittierten p53-defizienten Lymphomzellen.....	83
Abbildung 3.13	Induktion Seneszenz-assoziiierter Gene in Seneszenz kompromittierten p53-defizienten Lymphomzellen.....	83
Abbildung 3.14	Relative Expression von p53-Zielgenen und p53-assoziierten Genen nach 4h Tamoxifen	84
Abbildung 3.15	Induktion von p53-Zielgenen in seneszenten myc- p53 ^{ERTam/-} -LCs..	85
Abbildung 3.16	Induktion von Seneszenz-assoziierten Genen in seneszenten myc- p53 ^{ERTam/-} -Lymphomzellen.....	86
Abbildung 3.17	Überschneidung der differentiell regulierten Gene in <i>myc- p53+/+</i> - Lymphomzellen und myc- p53 ^{ERTam/-} -Lymphomzellen.....	87
Abbildung 3.18	RTq-PCR von Kontroll-Lymphomen nach fünftägiger Behandlung mit 4-OHT.....	87
Abbildung 3.19	GSEA Enrichment Plots.....	88
Abbildung 3.20	GSEA Enrichment Plots, Suv39h1-defiziente Lymphome.....	89
Abbildung 3.21	Gene Set enrichment Analysen der seneszenten Lymphomzellen im Vergleich zu den unbehandelten Lymphomzellen.....	90
Abbildung 3.22	phlda3 und sestrin2 in seneszenten Lymphomzellen.....	91
Abbildung 3.23	mRNA Expression von REDD1 und fbw7.....	92
Abbildung 3.24	Regulation von mTOR durch sestrin1/2 und phlda3.....	93
Abbildung 3.25	Immunoblot von AKT, Foxo3a und Ampka.....	94
Abbildung 3.26	mTORC1-Signalweg in TIS-seneszenten Lymphomzellen.....	95
Abbildung 3.27	Aktivierung von ERK in seneszenten Lymphomzellen.....	96
Abbildung 3.28	Zellzyklusanalyse in Kontrolllymphomen nach Behandlung mit Metformin und Triciribine.....	97
Abbildung 3.29	SA-β-Galactosidase Färbung in Kontroll-Lymphomen nach Behandlung mit Metformin und Triciribine	98

Abbildung 3.30	Zellzyklusanalyse in p53-defizienten Lymphomen nach Behandlung mit Metformin und Triciribine.....	98
Abbildung 3.31	SA- β -Galactosidase-Färbung in p53-defizienten Lymphomen nach Behandlung mit Metformin Triciribine	99
Abbildung 3.32	mTOR-Inhibition via p53 und TSC-knockdown.....	99
Abbildung 3.33	BrdU/PI-Färbung der mit Adriamycin behandelten Kontroll-Lymphome.....	100
Abbildung 3.34	BrdU/PI-Färbung der mit Adriamycin behandelten sh-TSC2-infizierten Lymphome.....	100
Abbildung 3.35	SA- β -Galactosidase Färbung in TSC2-defizienten Lymphomzellen	101
Abbildung 3.36	Proliferation nach Behandlung mit Rapamycin - Kontroll LCs.....	102
Abbildung 3.37	Proliferation nach Behandlung mit Rapamycin - p53null LCs.....	102
Abbildung 3.38	Rapamycin induziert einen SA-Galactosidase positiven Arrest unabhängig vom p53-Status.....	103
Abbildung 3.39	Immunoblot von Kontroll-Lymphomzellen nach fünf Tagen Behandlung mit Rapamycin.....	104
Abbildung 3.40	Westernblotanalyse von p53-defizienten Lymphomen nach fünf-tägiger Behandlung mit Rapamycin.....	105
Abbildung 3.41	Die Rapamycin-Behandlung führt nicht zur Induktion eines SASP.	105
Abbildung 3.42	Zellzyklusanalyse von Kontroll-Lymphomen und TSC2 -defizienten Lymphomen nach Behandlung mit ADR und Rapamycin	106
Abbildung 3.43	SA- β -Gal Färbung von Lymphomzellen nach fünftägiger Behandlung mit Adriamycin oder Rapamycin.....	107
Abbildung 3.44	Kaplan-Meier-Kurve – Kontroll-Lymphome.....	108
Abbildung 3.45	Paarvergleich der p53 ^{+/+} ;bcl2-Lymphome.....	108
Abbildung 3.46	SA- β -Galactosidase Färbung von Lymphknotenschnitten.....	109
Abbildung 3.47	Kaplan-Meier-Kurve - p53null Lymphome.....	110
Abbildung 3.48	Kaplan-Meier-Kurve Rapamycin Behandlung.....	110
Abbildung 3.49	Paarvergleich der p53null;bcl2-Lymphome.....	111
Abbildung 3.50	SA- β -Galactosidase Färbung von Lymphknotenschnitten.....	112
Abbildung 3.51	Zellzyklusanalyse von Rapamycin-resistenten (RR) Kontroll-Lymphomen und p53null-Lymphomen.....	113

Abbildung 3.52	SA- β -Galactosidase Färbung von Rapamycin-resistenten (RR) Kontroll-Lymphomen und p53null-Lymphomen nach Behandlung mit Metformin und Triciribine.....	114
----------------	---	-----

Tabellen

Tabelle 2.1	Verwendete Geräte.....	35
Tabelle 2.2	Software.....	36
Tabelle 2.3	Verbrauchsmaterialien.....	36
Tabelle 2.4	Chemikalien – Trockensubstanzen und Lösungen.....	36
Tabelle 2.5	Verwendete Puffer und deren Bestandteile.....	39
Tabelle 2.6	Verwendete Kits.....	42
Tabelle 2.7	Zellkulturmedien.....	42
Tabelle 2.8	Medien für die Bakterienkultivierung.....	43
Tabelle 2.9	Vektoren/Plasmide.....	43
Tabelle 2.10	Verwendete Primärantikörper für Western Blots und Facs.....	44
Tabelle 2.11	Verwendete Sekundärantikörper für Western Blots/Facs.....	45
Tabelle 2.12	Verwendete Enzyme.....	45
Tabelle 2.13	Verwendete TaqMan® Sonden.....	46
Tabelle 2.14	Verwendete PCR-Primer.....	48
Tabelle 2.15	Pipettierschema zur Kalzium-Chlorid-Transfektion.....	56
Tabelle 2.16	Übersicht über die verwendeten PCR-Ansätze.....	58
Tabelle 2.17	Übersicht über die verwendeten PCR-Programme.....	58
Tabelle 2.18	Reaktionsschritte der cDNA Synthese.....	60
Tabelle 2.19	RTq-PCR-Ansatz für die Verwendung der Reagenzien von Applied Biosystems.....	61
Tabelle 2.20	RTq-PCR-Bedingungen.....	61
Tabelle 2.21	Standardansatz zum Verdau mit Restriktionsendonukleasen.....	63
Tabelle 2.22	Standardansatz zur Ligation.....	64
Tabelle 2.23	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel im Westernblot.....	69

6 Abkürzungsverzeichnis

4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
ADR	Adriamycin
ALL	Akute lymphatische Leukämie
BrdU	Bromdesoxyuridin
ChIP/ChIP-Seq	Chromatin Immuno Precipitation/with DNA-Sequencing
CDK	Cyclin abhängige Kinase
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECM	Extrazellulärmatrix
ER-HBD	Östrogenrezeptor Hormonbindedomäne
EtOH	Ethanol
GSEA	Gene set enrichment Analyse
Gy	Gray
HSP	Hitzeschockprotein
kD	kilo Dalton
LC	Lymphom Zellen
LOH	Loss of heterozygosity – Verlust der Heterozygotie
MEF	embryonale Maus Fibroblasten
MCL	Mantelzell-Lymphom
mRNA	messenger RNA
NF-κB	nuclear factor-κB
OIS	Onkogen induzierte Seneszenz
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PIN	Prostatische intraepitheliale Neoplasie
PIP	Phosphatidylinositolbisphosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR

RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	rounds per minute
SAHF	Seneszenz assoziierte Heterochromatin Foci
SASP	Seneszenz assoziierter sekretorischer Phänotyp
SA- β -Gal	Seneszenz assoziierte beta-Galactosidase
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler
sh-RNA	short-hairpin RNA
TAM	Tamoxifen
TCN	Triciribine
TIS	Therapie induzierte Seneszenz
ut	unbehandelt
UV-Licht	ultra violette Licht

7 Literaturverzeichnis

1. HAYFLICK L, MOORHEAD PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961 Dec;25:585–621.
2. Cristofalo VJ, Pignolo RJ. Replicative Senescence of Human Fibroblast-Like Cells in Culture. *Physiol Rev.* 1993 Jan 7;73(3):617–38.
3. Wege H, Le HT, Chui MS, Liu L, Wu J, Giri R, Malhi H, Sappal BS, Kumaran V, Gupta S, Zern MA. Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential. *Gastroenterology.* 2003 Feb;124(2):432–44.
4. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 1990 May 31;345(6274):458–60.
5. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* 1998 Jan 16;279(5349):349–52.
6. Vaziri H, Benchimol S. From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp Gerontol.* 1996 Apr;31(1–2):295–301.
7. Vaziri H. Critical telomere shortening regulated by the ataxia-telangiectasia gene acts as a DNA damage signal leading to activation of p53 protein and limited life-span of human diploid fibroblasts. A review. *Biochemistry Mosc.* 1997 Nov;62(11):1306–10.
8. Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 May 9;92(10):4337–41.
9. Horikoshi T, Balin AK, Carter DM. Effect of oxygen on the growth of human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1986 Apr;86(4):424–7.
10. Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 1994 Nov 1;8(21):2540–51.
11. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 1997 Mar 7;88(5):593–602.
12. Jacobs JLL, Kieboom K, Marino S, DePinho RA, Lohuizen M van. The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature.* 1999 Jan 14;397(6715):164–8.
13. Narita M, Núñez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 2003 Jun 13;113(6):703–16.
14. Zhang Y, Yang J. The impact of cellular senescence in cancer therapy: is it true or not? *Acta Pharmacol Sin.* 2011 Oct;32(10):1199–207.

15. Sherwood SW, Rush D, Ellsworth JL, Schimke RT. Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988 Dec;85(23):9086–90.
16. Goldstein S. Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science*. 1990 Sep 7;249(4973):1129–33.
17. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M, Campisi J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(20):9363–7.
18. Lackner DH, Hayashi MT, Cesare AJ, Karlseder J. A genomics approach identifies senescence-specific gene expression regulation. *Aging Cell*. 2014;13(5):946–50.
19. Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, Sharpless NE. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest*. 2004 Nov;114(9):1299–307.
20. Dumont P, Burton M, Chen QM, Gonos ES, Fripiat C, Mazarati JB, Eliaers F, Remacle J, Toussaint O. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med*. 2000 Feb 1;28(3):361–73.
21. Pantoja C, Serrano M. Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene*. 1999 Sep 2;18(35):4974–82.
22. Sharpless NE, Ramsey MR, Balasubramanian P, Castrillon DH, DePinho RA. The differential impact of p16(INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis. *Oncogene*. 2004 Jan 15;23(2):379–85.
23. Coppé J-P, Desprez P-Y, Krtolica A, Campisi J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2010;5(1):99–118.
24. Schmitt CA. Cellular senescence and cancer treatment. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Jan;1775(1):5–20.
25. Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence☆. *Experimental Gerontology*. 2000 May;35(3):317–29.
26. Webley K, Bond JA, Jones CJ, Blaydes JP, Craig A, Hupp T, Wynford-Thomas D. Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. *Mol Cell Biol*. 2000 Apr;20(8):2803–8.
27. Dirac AMG, Bernards R. Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53. *J Biol Chem*. 2003 Apr 4;278(14):11731–4.
28. Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology*. 2004;5(1):1–10.
29. d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature Reviews Cancer*. 2008 Jul;8(7):512–22.

30. Herbig U, Jobling WA, Chen BPC, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell*. 2004 May 21;14(4):501–13.
31. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*. 1998 Mar 20;92(6):725–34.
32. Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Oct;2(10):731–7.
33. Palmero I, Pantoja C, Serrano M. p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature*. 1998 Sep 10;395(6698):125–6.
34. Radfar A, Unnikrishnan I, Lee H-W, DePinho RA, Rosenberg N. p19Arf induces p53-dependent apoptosis during Abelson virus-mediated pre-B cell transformation. *PNAS*. 1998 Oct 27;95(22):13194–9.
35. Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, Roussel MF. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev*. 1998 Jan 8;12(15):2424–33.
36. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlov I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*. 1998 Mar 20;92(6):713–23.
37. Lowe SW, Sherr CJ. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev*. 2003 Feb;13(1):77–83.
38. Bennecke M, Kriegl L, Bajbouj M, Retzlaff K, Robine S, Jung A, Arkan MC, Kirchner T, Greten FR. Ink4a/Arf and Oncogene-Induced Senescence Prevent Tumor Progression during Alternative Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2010 Aug 17;18(2):135–46.
39. Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res*. 1991 Sep;196(1):33–9.
40. Sage J, Miller AL, Pérez-Mancera PA, Wysocki JM, Jacks T. Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature*. 2003 Jul 10;424(6945):223–8.
41. Wei W, Herbig U, Wei S, Dutriaux A, Sedivy JM. Loss of retinoblastoma but not p16 function allows bypass of replicative senescence in human fibroblasts. *EMBO Rep*. 2003 Nov;4(11):1061–6.
42. Harbour JW, Dean DC. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2000 Apr;2(4):E65–7.
43. Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, Campisi J. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J*. 2003 Aug 15;22(16):4212–22.

44. Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Apr 13;96(8):4240–5.
45. Tresini M, Mawal-Dewan M, Cristofalo VJ, Sell C. A phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor induces a senescent-like growth arrest in human diploid fibroblasts. *Cancer Res*. 1998 Jan 1;58(1):1–4.
46. Courtois-Cox S, Genter Williams SM, Reczek EE, Johnson BW, McGillicuddy LT, Johannessen CM, Hollstein PE, MacCollin M, Cichowski K. A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell*. 2006 Dec;10(6):459–72.
47. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin H-K, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*. 2005 Aug 4;436(7051):725–30.
48. Alimonti A, Nardella C, Chen Z, Clohessy JG, Carracedo A, Trotman LC, Cheng K, Varmeh S, Kozma SC, Thomas G, Rosivatz E, Woscholski R, Cognetti F, Scher HI, Pandolfi PP. A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *J Clin Invest*. 2010 Mar;120(3):681–93.
49. Roninson IB, Broude EV, Chang B-D. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resistance Updates*. 2001 Oct;4(5):303–13.
50. Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AHFM, Schlegelberger B, Stein H, Dörken B, Jenuwein T, Schmitt CA. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*. 2005 Aug 4;436(7051):660–5.
51. BRAF-V600 Mutationsstatus - Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung - LMU München [Internet]. [cited 2014 Aug 12]. Available from: http://www.neuropathologie.med.uni-muenchen.de/genetik/braf-v600_mutationsstatus/index.html
52. Michaloglou C, Vredeveld LCW, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peeper DS. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*. 2005 Aug 4;436(7051):720–4.
53. Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguría A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, Beach D, Serrano M. Tumour biology: Senescence in premalignant tumours. *Nature*. 2005 Aug 4;436(7051):642–642.
54. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2002 Apr;2(4):277–88.
55. Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Lee S, Baranov E, Hoffman RM, Lowe SW. A Senescence Program Controlled by p53 and p16INK4a Contributes to the Outcome of Cancer Therapy. *Cell*. 2002 May 3;109(3):335–46.

56. Suzuki K, Mori I, Nakayama Y, Miyakoda M, Kodama S, Watanabe M. Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening. *Radiat Res.* 2001 Jan;155(1 Pt 2):248–53.
57. Chang B-D, Broude EV, Dokmanovic M, Zhu H, Ruth A, Xuan Y, Kandel ES, Lausch E, Christov K, Roninson IB. A Senescence-like Phenotype Distinguishes Tumor Cells That Undergo Terminal Proliferation Arrest after Exposure to Anticancer Agents [Internet]. [cited 2014 Aug 13]. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org>
58. Holliday R, Tarrant GM. Altered enzymes in ageing human fibroblasts. *Nature.* 1972 Jul 7;238(5358):26–30.
59. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992 Jul 2;358(6381):15–6.
60. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000 Nov 16;408(6810):307–10.
61. Oren M, Maltzman W, Levine AJ. Post-translational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. *Mol Cell Biol.* 1981 Feb;1(2):101–10.
62. Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 1993 Jul;7(7A):1126–32.
63. Zhang Y, Xiong Y. Control of p53 ubiquitination and nuclear export by MDM2 and ARF. *Cell Growth Differ.* 2001 Apr;12(4):175–86.
64. Kitano H. Opinion: Cancer as a robust system: implications for anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer.* 2004 Mar;4(3):227–35.
65. Bond GL, Hu W, Levine AJ. MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting. *Curr Cancer Drug Targets.* 2005 Feb;5(1):3–8.
66. Sherr CJ, Weber JD. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev.* 2000 Feb;10(1):94–9.
67. Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev.* 1998 Oct 1;12(19):2973–83.
68. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature.* 1992 Mar 19;356(6366):215–21.
69. Nichols KE, Malkin D, Garber JE, Fraumeni JF, Li FP. Germ-Line P53 Mutations Predispose to a Wide Spectrum of Early-Onset Cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001 Jan 2;10(2):83–7.
70. Brady CA, Attardi LD. p53 at a glance. *J Cell Sci.* 2010 Aug 1;123(Pt 15):2527–32.
71. Brown JP, Wei W, Sedivy JM. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science.* 1997 Aug 8;277(5327):831–4.

72. del Arroyo AG, El Messaoudi S, Clark PA, James M, Stott F, Bracken A, Helin K, Peters G. E2F-dependent induction of p14ARF during cell cycle re-entry in human T cells. *Cell Cycle*. 2007 Nov 1;6(21):2697–705.
73. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Sep;8(9):729–40.
74. Coppé J-P, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*. 2008 Dec 2;6(12):2853–68.
75. Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*. 2007 Feb 8;445(7128):656–60.
76. Chien Y, Scuoppo C, Wang X, Fang X, Balgley B, Bolden JE, Premrurit P, Luo W, Chicas A, Lee CS, Kogan SC, Lowe SW. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev*. 2011 Oct 15;25(20):2125–36.
77. Leong DJ, Sun HB. Events in articular chondrocytes with aging. *Curr Osteoporos Rep*. 2011 Dec;9(4):196–201.
78. Krizhanovsky V, Xue W, Zender L, Yon M, Hernando E, Lowe SW. Implications of cellular senescence in tissue damage response, tumor suppression, and stem cell biology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2008;73:513–22.
79. Kruse J-P, Gu W. Modes of p53 regulation. *Cell*. 2009 May 15;137(4):609–22.
80. Cawley S, Bekiranov S, Ng HH, Kapranov P, Sekinger EA, Kampa D, Piccolboni A, Sementchenko V, Cheng J, Williams AJ, Wheeler R, Wong B, Drenkow J, Yamanaka M, Patel S, Brubaker S, Tammana H, Helt G, Struhl K, Gingeras TR. Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell*. 2004 Feb 20;116(4):499–509.
81. Wei C-L, Wu Q, Vega VB, Chiu KP, Ng P, Zhang T, Shahab A, Yong HC, Fu Y, Weng Z, Liu J, Zhao XD, Chew JL, Lee YL, Kuznetsov VA, Sung WK, Miller LD, Lim B, Liu ET, Yu Q, Ng HH, Ruan Y. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell*. 2006 Jan 13;124(1):207–19.
82. Millau J-F, Bandele OJ, Perron J, Bastien N, Bouchard ÉF, Gaudreau L, Bell DA, Drouin R. Formation of stress-specific p53 binding patterns is influenced by chromatin but not by modulation of p53 binding affinity to response elements. *Nucl Acids Res*. 2011 Jan 4;39(8):3053–63.
83. Nili EL, Field Y, Lubling Y, Widom J, Oren M, Segal E. p53 binds preferentially to genomic regions with high DNA-encoded nucleosome occupancy. *Genome Res*. 2010 Jan 10;20(10):1361–8.
84. Menendez D, Inga A, Resnick MA. The expanding universe of p53 targets. *Nat Rev Cancer*. 2009 Oct;9(10):724–37.

85. Zilfou JT, Lowe SW. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Nov;1(5):a001883.
86. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 May;9(5):402–12.
87. Vousden KH, Ryan KM. p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2009 Oct;9(10):691–700.
88. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell.* 2009 May 1;137(3):413–31.
89. Crighton D, Wilkinson S, Ryan KM. DRAM links autophagy to p53 and programmed cell death. *Autophagy.* 2007 Feb;3(1):72–4.
90. Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ. p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature.* 2007 Nov 29;450(7170):721–4.
91. Teodoro JG, Parker AE, Zhu X, Green MR. P53-Mediated Inhibition of Angiogenesis Through Up-Regulation of a Collagen Prolyl Hydroxylase. *Science.* 2006 Aug 18;313(5789):968–71.
92. Newcomb EW. P53 gene mutations in lymphoid diseases and their possible relevance to drug resistance. *Leuk Lymphoma.* 1995 Apr;17(3–4):211–21.
93. JAG. Dr. Sharman's CLL & Lymphoma Blog: 17p Deletion in CLL [Internet]. [cited 2014 Aug 18]. Available from: http://www.cll-nhl.com/2012/10/17p-deletion-in-cll.html#.U_ivhKPYfKs
94. Schmitt CA, McCurrach ME, de Stanchina E, Wallace-Brodeur RR, Lowe SW. INK4a/ARF mutations accelerate lymphomagenesis and promote chemoresistance by disabling p53. *Genes Dev.* 1999 Oct 15;13(20):2670–7.
95. Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW, Magrath IT, Knowles DM, Dalla-Favera R. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991 Jun 15;88(12):5413–7.
96. Neubauer A, He M, Schmidt CA, Huhn D, Liu ET. Genetic alterations in the p53 gene in the blast crisis of chronic myelogenous leukemia: analysis by polymerase chain reaction based techniques. *Leukemia.* 1993 Apr;7(4):593–600.
97. Hermeking H, Rago C, Schuhmacher M, Li Q, Barrett JF, Obaya AJ, O'Connell BC, Mateyak MK, Tam W, Kohlhuber F, Dang CV, Sedivy JM, Eick D, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000 Feb 29;97(5):2229–34.
98. Taub R, Kirsch I, Morton C, Lenoir G, Swan D, Tronick S, Aaronson S, Leder P. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982 Dec;79(24):7837–41.

99. Adams JM, Harris AW, Pinkert CA, Corcoran LM, Alexander WS, Cory S, Palmiter RD, Brinster RL. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature*. 1985 Dec 12;318(6046):533–8.
100. Boxer LM, Dang CV. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene*. 2001 Sep 10;20(40):5595–610.
101. Adams JM, Cory S. Transgenic models of tumor development. *Science*. 1991 Nov 22;254(5035):1161–7.
102. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, Connors JM, Sehn LH, Farinha P, Horsman DE, Gascoyne RD. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood*. 2009 Oct 22;114(17):3533–7.
103. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*. 1992 Apr 3;69(1):119–28.
104. Eischen CM, Weber JD, Roussel MF, Sherr CJ, Cleveland JL. Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev*. 1999 Oct 15;13(20):2658–69.
105. Grandori C, Wu K-J, Fernandez P, Ngouenet C, Grim J, Clurman BE, Moser MJ, Oshima J, Russell DW, Swisshelm K, Frank S, Amati B, Dalla-Favera R, Monnat RJ Jr. Werner syndrome protein limits MYC-induced cellular senescence. *Genes Dev*. 2003 Jan 7;17(13):1569–74.
106. Reimann M, Lee S, Loddenkemper C, Dörr JR, Tabor V, Aichele P, Stein H, Dörken B, Jenuwein T, Schmitt CA. Tumor stroma-derived TGF-beta limits myc-driven lymphomagenesis via Suv39h1-dependent senescence. *Cancer Cell*. 2010 Mar 16;17(3):262–72.
107. Yang Q, Guan K-L. Expanding mTOR signaling. *Cell Res*. 2007 Aug;17(8):666–81.
108. Sarbassov DD, Ali SM, Kim D-H, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*. 2004 Jul 27;14(14):1296–302.
109. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen J-H, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*. 2006 Apr 21;22(2):159–68.
110. Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 7;102(23):8204–9.
111. Corradetti MN, Guan K-L. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene*. 2006 Oct 16;25(48):6347–60.
112. Loayza-Puch F, Drost J, Rooijers K, Lopes R, Elkon R, Agami R. p53 induces transcriptional and translational programs to suppress cell proliferation and growth. *Genome Biology*. 2013 Apr 17;14(4):R32.

113. Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Aug;5(8):671–88.
114. Plas DR, Thompson CB. Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene.* 2005;24(50):7435–42.
115. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell.* 1997 Dec;1(1):3–11.
116. Dulić V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, Elledge SJ, Reed SI. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell.* 1994 Mar 25;76(6):1013–23.
117. Pelengaris S, Khan M. The many faces of c-MYC. *Arch Biochem Biophys.* 2003 Aug 15;416(2):129–36.
118. Jacks T, Remington L, Williams BO, Schmitt EM, Halachmi S, Bronson RT, Weinberg RA. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol.* 1994 Jan 1;4(1):1–7.
119. Eilers M, Picard D, Yamamoto KR, Bishop JM. Chimaeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. *Nature.* 1989 Jul 6;340(6228):66–8.
120. Littlewood TD, Hancock DC, Danielian PS, Parker MG, Evan GI. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res.* 1995 May 25;23(10):1686–90.
121. Bøe CA, Garcia I, Pai C-C, Sharom JR, Skjølberg HC, Boye E, Kearsey S, Macneill SA, Tyers MD, Grallert B. Rapid regulation of protein activity in fission yeast. *BMC Cell Biology.* 2008 May 5;9(1):23.
122. Christophorou MA, Martin-Zanca D, Soucek L, Lawlor ER, Brown-Swigart L, Verschuren EW, Evan GI. Temporal dissection of p53 function in vitro and in vivo. *Nat Genet.* 2005 Jul;37(7):718–26.
123. Martins CP, Brown-Swigart L, Evan GI. Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell.* 2006 Dec 29;127(7):1323–34.
124. Codogno P, Meijer AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ.* 2005;12(S2):1509–18.
125. Yang L, Dan HC, Sun M, Liu Q, Sun X, Feldman RI, Hamilton AD, Polokoff M, Nicosia SV, Herlyn M, Sebti SM, Cheng JQ. Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt. *Cancer Res.* 2004 Jul 1;64(13):4394–9.
126. Berndt N, Yang H, Trinczek B, Betzi S, Zhang Z, Wu B, Lawrence NJ, Pellecchia M, Schönbrunn E, Cheng JQ, Sebti SM. The Akt activation inhibitor TCN-P inhibits Akt phosphorylation by binding to the PH domain of Akt and blocking its recruitment to the plasma membrane. *Cell Death Differ.* 2010 Nov;17(11):1795–804.

127. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell*. 2006 Apr 1;5(2):187–95.
128. Kortlever RM, Higgins PJ, Bernards R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol*. 2006 Aug;8(8):877–84.
129. Kimura SH, Nojima H. Cyclin G1 associates with MDM2 and regulates accumulation and degradation of p53 protein. *Genes Cells*. 2002 Aug;7(8):869–80.
130. Zhao L, Samuels T, Winckler S, Korgaonkar C, Tompkins V, Horne MC, Quelle DE. Cyclin G1 has growth inhibitory activity linked to the ARF-Mdm2-p53 and pRb tumor suppressor pathways. *Mol Cancer Res*. 2003 Jan;1(3):195–206.
131. Li J, Tan M, Li L, Pamarthy D, Lawrence TS, Sun Y. SAK, a new polo-like kinase, is transcriptionally repressed by p53 and induces apoptosis upon RNAi silencing. *Neoplasia*. 2005 Apr;7(4):312–23.
132. Kawase T, Ohki R, Shibata T, Tsutsumi S, Kamimura N, Inazawa J, Ohta T, Ichikawa H, Aburatani H, Tashiro F, Taya Y. PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt. *Cell*. 2009 Feb 6;136(3):535–50.
133. Budanov AV, Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*. 2008 Aug 8;134(3):451–60.
134. DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW. Hypoxia regulates TSC1/2–mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14–3–3 shuttling. *Genes Dev*. 2008 Jan 15;22(2):239–51.
135. Dennis MD, Coleman CS, Berg A, Jefferson LS, Kimball SR. REDD1 enhances protein phosphatase 2A-mediated dephosphorylation of Akt to repress mTORC1 signaling. *Sci Signal*. 2014 Jul 22;7(335):ra68.
136. Mao J-H, Kim I-J, Wu D, Climent J, Kang HC, DelRosario R, Balmain A. FBXW7 Targets mTOR for Degradation and Genetically Cooperates with PTEN in Tumor Suppression. *Science*. 2008 Sep 12;321(5895):1499–502.
137. Young ARJ, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JFJ, Tavaré S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM, Narita M. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev*. 2009 Jan 4;23(7):798–803.
138. Rosenfeldt MT, O'Prey J, Morton JP, Nixon C, MacKay G, Mrowinska A, Au A, Rai TS, Zheng L, Ridgway R, Adams PD, Anderson KI, Gottlieb E, Sansom OJ, Ryan KM. p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. *Nature*. 2013 Dec 12;504(7479):296–300.
139. Lujambio A, Akkari L, Simon J, Grace D, Tschaharganeh DF, Bolden JE, Zhao Z, Thapar V, Joyce JA, Krizhanovsky V, Lowe SW. Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. *Cell*. 2013 Apr 11;153(2):449–60.
140. Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J*. 1997 Jun 16;16(12):3693–704.

141. Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donzé O, Lin TA, Lawrence JC, Sonenberg N. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature*. 1994 Oct 27;371(6500):762–7.
142. Choo AY, Yoon S-O, Kim SG, Roux PP, Blenis J. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *PNAS*. 2008 Nov 11;105(45):17414–9.
143. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001 Oct 15;108(8):1167–74.
144. Shi W-Y, Xiao D, Wang L, Dong L-H, Yan Z-X, Shen Z-X, Chen SJ, Chen Y, Zhao WL. Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy. *Cell Death Dis*. 2012 Mar 1;3(3):e275.
145. Petrich AM, Leshchenko V, Kuo P-Y, Xia B, Thirukonda VK, Ulahannan N, Gordon S, Fazzari MJ, Ye BH, Sparano JA, Parekh S. Akt Inhibitors MK-2206 and Nelfinavir Overcome mTOR Inhibitor Resistance in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2012 Jan 5;18(9):2534–44.
146. Dimauro T, David G. Ras-induced senescence and its physiological relevance in cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010 Dec;10(8):869–76.
147. Bavik C, Coleman I, Dean JP, Knudsen B, Plymate S, Nelson PS. The Gene Expression Program of Prostate Fibroblast Senescence Modulates Neoplastic Epithelial Cell Proliferation through Paracrine Mechanisms. *Cancer Res*. 2006 Jan 15;66(2):794–802.
148. Coppé J-P, Patil CK, Rodier F, Krtolica A, Beauséjour CM, Parrinello S, Hodgson JG, Chin K, Desprez PY, Campisi J. A Human-Like Senescence-Associated Secretory Phenotype Is Conserved in Mouse Cells Dependent on Physiological Oxygen. *PLOS ONE*. 2010 Feb 12;5(2):e9188.
149. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez P-Y, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *PNAS*. 2001 Sep 10;98(21):12072–7.
150. Acosta JC, O'Loughlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, Fumagalli M, Da Costa M, Brown C, Popov N, Takatsu Y, Melamed J, d'Adda di Fagagna F, Bernard D, Hernando E, Gil J. Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell*. 2008 Jun 13;133(6):1006–18.
151. Kuilman T, Peeper DS. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer*. 2009 Feb;9(2):81–94.
152. Laberge R-M, Sun Y, Orjalo AV, Patil CK, Freund A, Zhou L, Curran SC, Davalos AR, Wilson-Edell KA, Liu S, Limbad C, Demaria M, Li P, Hubbard GB, Ikeno Y, Javors M, Desprez PY, Benz CC, Kapahi P, Nelson PS, Campisi J. MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol*. 2015 Aug;17(8):1049–61.

153. Wheaton K, Muir J, Ma W, Benchimol S. BTG2 antagonizes Pin1 in response to mitogens and telomere disruption during replicative senescence. *Aging Cell*. 2010 Oct;9(5):747–60.
154. Cyclin G1 is involved in G2/M arrest in response to DNA damage and in growth control after damage recovery. , Published online: 01 June 2001; | doi:101038/sj.onc1204270 [Internet]. 2001 Jun 1 [cited 2014 Oct 3];20(25). Available from: <http://www.nature.com/onc/journal/v20/n25/abs/1204270a.html>
155. Lee J-H, Kang Y, Khare V, Jin Z-Y, Kang M-Y, Yoon Y, Hyun JW, Chung MH, Cho SI, Jun JY, Chang IY, You HJ. The p53-inducible gene 3 (PIG3) contributes to early cellular response to DNA damage. *Oncogene*. 2010 Mar 11;29(10):1431–50.
156. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Molecular Cell*. 2001 Mar 1;7(3):683–94.
157. Zilfou JT, Spector MS, Lowe SW. Slugging it out: fine tuning the p53-PUMA death connection. *Cell*. 2005 Nov 18;123(4):545–8.
158. Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*. 2002 Sep;10(3):457–68.
159. Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaeberlein M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature*. 2013 Jan 17;493(7432):338–45.
160. Dörr JR, Yu Y, Milanovic M, Beuster G, Zasada C, Däbritz JHM, Lisec J, Lenze D, Gerhardt A, Schleicher K, Kratzat S, Purfürst B, Walenta S, Mueller-Klieser W, Gräler M, Hummel M, Keller U, Buck AK, Dörken B, Willmitzer L, Reimann M, Kempa S, Lee S, Schmitt CA. Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature*. 2013 Sep 19;501(7467):421–5.
161. Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, Ru B, Edgar BA, Pan D. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat Cell Biol*. 2003 Jun;5(6):578–81.
162. Langkau N, Martin N, Brandt R, Zügge K, Quast S, Wiegele G, Jauch A, Rehm M, Kuhl A, Mack-Vetter M, Zimmerhackl LB, Janssen B. TSC1 and TSC2 mutations in tuberous sclerosis, the associated phenotypes and a model to explain observed TSC1/TSC2 frequency ratios. *Eur J Pediatr*. 2002 Jul 1;161(7):393–402.
163. Feng Z. p53 regulation of the IGF-1/AKT/mTOR pathways and the endosomal compartment. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Feb;2(2):a001057.
164. Feng Z, Hu W, Stanchina E de, Teresky AK, Jin S, Lowe S, Levine AJ. The Regulation of AMPK β 1, TSC2, and PTEN Expression by p53: Stress, Cell and Tissue Specificity, and the Role of These Gene Products in Modulating the IGF-1-AKT-mTOR Pathways. *Cancer Res*. 2007 Jan 4;67(7):3043–53.
165. Yu B, Zhou X, Xiao X, Yan S, Qin T, Shi D. Activation and clinicopathologic significance of AKT/mTOR signaling pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2009 Jan;38(1):35–41.

166. Leseux L, Hamdi SM, Al Saati T, Capilla F, Recher C, Laurent G, Bezombes C. Syk-dependent mTOR activation in follicular lymphoma cells. *Blood*. 2006 Dec 15;108(13):4156–62.
167. Vega F, Medeiros LJ, Leventaki V, Atwell C, Cho-Vega JH, Tian L, Claret FX, Rassidakis GZ. Activation of mammalian target of rapamycin signaling pathway contributes to tumor cell survival in anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Res*. 2006 Jul 1;66(13):6589–97.
168. Witzig TE, Gupta M. Signal transduction inhibitor therapy for lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:265–70.
169. Xu Z-Z, Xia Z-G, Wang A-H, Wang W-F, Liu Z-Y, Chen L-Y, Li JM. Activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway in diffuse large B cell lymphoma: clinical significance and inhibitory effect of rituximab. *Ann Hematol*. 2013 Oct;92(10):1351–8.
170. Zhang Z-J, Zheng Z-J, Kan H, Song Y, Cui W, Zhao G, Kip KE. Reduced Risk of Colorectal Cancer With Metformin Therapy in Patients With Type 2 Diabetes A meta-analysis. *Dia Care*. 2011 Jan 10;34(10):2323–8.
171. Sadeghi N, Abbruzzese JL, Yeung S-CJ, Hassan M, Li D. Metformin use is associated with better survival of diabetic patients with pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2012 May 15;18(10):2905–12.
172. Chlebowski RT, McTiernan A, Wactawski-Wende J, Manson JE, Aragaki AK, Rohan T, Ipp E, Kaklamani VG, Vitolins M, Wallace R, Gunter M, Phillips LS, Strickler H, Margolis K, Euhus DM. Diabetes, Metformin, and Breast Cancer in Postmenopausal Women. *JCO*. 2012 Jun 11;JCO.2011.39.7505.
173. Gopal AK, Kahl BS, de Vos S, Wagner-Johnston ND, Schuster SJ, Jurczak WJ, Flinn IW, Flowers CR, Martin P, Viardot A, Blum KA, Goy AH, Davies AJ, Zinzani PL, Dreyling M, Johnson D, Miller LL, Holes L, Li D, Dansey RD, Godfrey WR, Salles GA. PI3K δ Inhibition by Idelalisib in Patients with Relapsed Indolent Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2014;370(11):1008–18.
174. Chatterjee A, Mukhopadhyay S, Tung K, Patel D, Foster DA. Rapamycin-induced G1 cell cycle arrest employs both TGF- β and Rb pathways. *Cancer Letters*. 2015 May 1;360(2):134–40.
175. Donehower LA. Rapamycin as longevity enhancer and cancer preventative agent in the context of p53 deficiency. *Aging (Albany NY)*. 2012 Oct 27;4(10):660–1.
176. Nagata Y, Takahashi A, Ohnishi K, Ota I, Ohnishi T, Tojo T, Taniguchi S. Effect of rapamycin, an mTOR inhibitor, on radiation sensitivity of lung cancer cells having different p53 gene status. *Int J Oncol*. 2010 Oct;37(4):1001–10.
177. Demidenko ZN, Korotchkina LG, Gudkov AV, Blagosklonny MV. Paradoxical suppression of cellular senescence by p53. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 May 25;107(21):9660–4.
178. Korotchkina LG, Leontieva OV, Bukreeva EI, Demidenko ZN, Gudkov AV, Blagosklonny MV. The choice between p53-induced senescence and quiescence is determined in part by the mTOR pathway. *Aging (Albany NY)*. 2010 Jun;2(6):344–52.

179. Wall M, Poortinga G, Stanley KL, Lindemann RK, Bots M, Chan CJ, Bywater MJ, Kinross KM, Astle MV, Waldeck K, Hannan KM, Shortt J, Smyth MJ, Lowe SW, Hannan RD, Pearson RB, Johnstone RW, McArthur GA. The mTORC1 inhibitor everolimus prevents and treats E μ -Myc lymphoma by restoring oncogene-induced senescence. *Cancer Discov.* 2013 Jan;3(1):82–95.
180. Huang S, Bjornsti M-A, Houghton PJ. Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance. *Cancer Biol Ther.* 2003 Jun;2(3):222–32.
181. Sánchez-Fructuoso AI. Everolimus: an update on the mechanism of action, pharmacokinetics and recent clinical trials. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008 Jun;4(6):807–19.
182. Hosoi H, Dilling MB, Liu LN, Danks MK, Shikata T, Sekulic A, Abraham RT, Lawrence JC Jr, Houghton PJ. Studies on the mechanism of resistance to rapamycin in human cancer cells. *Mol Pharmacol.* 1998 Nov;54(5):815–24.
183. Choo AY, Blenis J. Not all substrates are treated equally: implications for mTOR, rapamycin-resistance and cancer therapy. *Cell Cycle.* 2009 Feb 15;8(4):567–72.
184. Wan X, Harkavy B, Shen N, Grohar P, Helman LJ. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene.* 2006 Sep 25;26(13):1932–40.
185. Soares HP, Ni Y, Kisfalvi K, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. Different Patterns of Akt and ERK Feedback Activation in Response to Rapamycin, Active-Site mTOR Inhibitors and Metformin in Pancreatic Cancer Cells. *PLoS ONE.* 2013 Feb 21;8(2):e57289.
186. Wang X, Hawk N, Yue P, Kauh J, Ramalingam SS, Fu H, Khuri FR, Sun SY. Overcoming mTOR inhibition-induced paradoxical activation of survival signaling pathways enhances mTOR inhibitors' anticancer efficacy. *Cancer Biol Ther.* 2008 Dec;7(12):1952–8.
187. Liu Y, Sun S-Y, Owonikoko TK, Sica GL, Curran WJ, Khuri FR, Deng X. Rapamycin Induces Bad Phosphorylation in Association with Its Resistance to Human Lung Cancer Cells. *Mol Cancer Ther.* 2012 Jan 1;11(1):45–56.
188. Wang J, Ouyang W, Li J, Wei L, Ma Q, Zhang Z, Tong Q, He J, Huang C. Loss of tumor suppressor p53 decreases PTEN expression and enhances signaling pathways leading to activation of activator protein 1 and nuclear factor kappaB induced by UV radiation. *Cancer Res.* 2005 Aug 1;65(15):6601–11.

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Anne Gerhardt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Identifikation der p53-Zielgene *phlda3* und *sestrin2* als Teil eines mTOR-vermittelten Seneszenz-Signalwegs“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Anne Gerhardt hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1: Jan R. Dörr, Yong Yu, Maja Milanovic, Gregor Beuster, Christin Zasada, J. Henry M. Däbritz, Jan Lisec, Dido Lenze, Anne Gerhardt, Katharina Schleicher, Susanne Kratzat, Bettina Purfürst, Stefan Walenta, Wolfgang Mueller-Klieser, Markus Gräler, Michael Hummel, Ulrich Keller, Andreas K. Buck, Bernd Dörken, Lothar Willmitzer, Maurice Reimann, Stefan Kempa, Soyoung Lee & Clemens A. Schmitt, Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy, Nature, 2013

Beitrag im Einzelnen:

Rapamycin induzierte Seneszenz als Beispiel für Seneszenz ohne SASP und ohne Hypermetabolismus, siehe Supplementary Figure 9.

Datum

Unterschrift

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Clemens Schmitt möchte ich für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Sachmittel herzlich danken. Ich verdanke ihm darüber hinaus hilfreiche Unterstützung und viele anregende Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Jan Rafael Dörr, der mich jederzeit bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit fachlich und emotional unterstützt hat. Seine Ideen haben wesentlich zum Erstellen der Arbeit beigetragen.

Frau Dr. Maja Milanovic danke ich für die Hilfe bei den Klonierungsarbeiten, der Erstellung der GSEA-Analysen und für die zahlreichen konstruktiven Gespräche bei der Auswertung der Daten.

Weiterer ganz besonderer Dank gilt den MTAs des Labors. Ohne ihre Hilfe, insbesondere bei den Maus-Experimenten, hätte ich viele Experimente nicht durchführen können.

Ich möchte mich weiterhin bei allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben:

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir während der Anfertigung der Doktorarbeit immerzu unterstützend und liebevoll zur Seite standen. Ganz besonderen Dank dafür, dass Sie meinen Bruder und mich immer bedingungslos unterstützen.

Allen meinen lieben Freunden danke ich für die Ausdauer, Ruhe und Geduld, mit der sie mich immer wieder aufgemuntert und motiviert haben.

10 Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

11 Publikationen

Publikation:

Jan R. Dörr, Yong Yu, Maja Milanovic, Gregor Beuster, Christin Zasada, J. Henry M. Däbritz, Jan Lisec, Dido Lenze, Anne Gerhardt, Katharina Schleicher, Susanne Kratzat, Bettina Purfürst, Stefan Walenta, Wolfgang Mueller-Klieser, Markus Gräler, Michael Hummel, Ulrich Keller, Andreas K. Buck, Bernd Dörken, Lothar Willmitzer, Maurice Reimann, Stefan Kempa, Soyoun Lee & Clemens A. Schmitt, „Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy“, Nature, 2013

Vorträge:

Gerhardt, A.: „p53 vermittelte Induktion von Seneszenz via Inhibition von mTOR als Therapieprinzip maligner Lymphome in vitro und in vivo“
in der Sitzung „Tumor-/Zellbiologie“, Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie vom 14. bis zum 18. Oktober 2016 in Leipzig

Gerhardt, A.: „p53 abhängige Signalwege zellulärer Seneszenz in Lymphomen“
in der Sitzung „Tumorbiologie II“, Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie vom 18. - 22. Oktober 2013 in Wien

Gerhardt, A.: „Identification of p53 target genes in senescent lymphoma cells“
ESC - European Students Conference „Die Dimensionen des Krebses – von Mikro zu Makro“; 10/2010