

**Das RNA-bindende Protein RBM47 ist ein neuer  
Regulator des p53-p21-Signalwegs auf  
transkriptioneller und translationaler Ebene**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Claudia Radine**

aus Soest

Düsseldorf, März 2020

aus dem Labor für Molekulare Radioonkologie  
der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Reiner U. Jänicke
2. PD Dr. Sven B. Gould

Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2020



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Tumorsuppressor p53 .....	1
1.1.1 Aufbau von p53 .....	3
1.1.2 p53, der Zellzyklus und das Zellschicksal .....	4
1.1.3 Regulation von p53 .....	12
1.2 Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor p21 .....	14
1.2.1 Regulation von p21 .....	16
1.3 RNA-bindende Proteine.....	17
1.3.1 Aufbau und Funktion von RBPs .....	17
1.3.2 Regulation von p21 durch RBPs .....	19
1.3.3 RBM47 .....	20
1.4 MAPK .....	23
1.4.1 ERK.....	24
1.4.2 JNK .....	24
1.4.3 p38 .....	25
1.4.4 Regulation von p21 durch MAPK.....	25
1.4.5 Regulation von RBPs durch MAPK.....	26
1.5 Zielsetzung .....	28
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>29</b>
2.1 Material.....	29
2.1.1 Chemikalien .....	29
2.1.2 Inhibitoren .....	30
2.1.3 Enzyme .....	30
2.1.4 Medien und Zelllinien .....	30
2.1.5 TaqMan® Gene Expression Assays .....	31
2.1.6 siRNAs .....	31
2.1.7 Antikörper.....	31
2.1.8 Oligonukleotide und Plasmid-DNA.....	32
2.1.9 Größenstandard.....	32
2.1.10 Kits .....	33
2.1.11 Geräte .....	33
2.1.12 Software.....	34
2.2 Methoden.....	35

2.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	35
2.2.2	Stimulation von Zellen.....	35
2.2.3	Transiente Transfektion von Humanzellen mit <i>small-interfering</i> RNAs (siRNAs) .....	36
2.2.4	Transiente Transfektion von Humanzellen mit Plasmid-DNA .....	37
2.2.5	Kolorimetrischer SA- $\beta$ -Gal-Nachweis.....	38
2.2.6	Durchflusszytometrische Quantifizierung der SA- $\beta$ -Gal-Aktivität .....	39
2.2.7	Messung des Zelltods durch Propidiumiodid-Aufnahme .....	40
2.2.8	LDH-Zytotoxizitätstest.....	41
2.2.9	Fluorometrischer Substrattest zur Messung der Caspase-3- Aktivität.....	42
2.2.10	Präparation von Zellextrakten .....	43
2.2.11	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford .....	43
2.2.12	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
2.2.13	Western Blot.....	45
2.2.14	Untersuchung der Proteinstabilität.....	46
2.2.15	Isolierung von RNA .....	47
2.2.16	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkription .....	47
2.2.17	Quantitative Real-Time PCR.....	48
2.2.18	Bestimmung der mRNA-Stabilität .....	49
2.2.19	Luciferase-Assay.....	50
2.2.20	Erstellung des pGL4.10-p53-Prom-356bp-Plasmids.....	51
2.2.21	Mini-DNA-Präparation aus <i>E.coli</i> .....	54
2.2.22	Isolierung von Plasmid-DNA .....	55
2.2.23	p21mRNA-Immunpräzipitation .....	56
2.2.24	Denaturierende RNA-Gelelektrophorese .....	59
2.2.25	Statistik.....	59
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>60</b>
3.1	Charakterisierung der IR-induzierten Schädigungsantwort von HCT116-Zellen .....	60
3.2	Verifizierung der Bindung von RBM47 an die p21 mRNA .....	61
3.3	MAPK regulieren die p21-Expression auf verschiedenen Ebenen .....	62
3.3.1	ERK reguliert die p21-Expression auf post-translationaler Ebene .....	64
3.3.2	Der JNK-Inhibitor SP600125 verringert die p21-Proteinexpression....	65
3.3.3	Die MAPK p38 reguliert die p21-Expression auf translationaler Ebene.....	67

3.4	RBM47 reguliert den p53-p21-Signalweg transkriptionell und translational .....	70
3.4.1	Charakterisierung der RBM47-Expression nach DNA-Schädigung ....	70
3.4.2	RBM47 ist ein positiver Regulator der p53-Promotoraktivität .....	72
3.4.3	RBM47 erhöht die IR-induzierte p21-Promotor-Aktivität in Abhängigkeit von p53.....	76
3.4.4	RBM47 wird für die IR-induzierte Seneszenz benötigt.....	79
3.4.5	RBM47 wird auch in weiteren Tumorentitäten für die p53-Expression benötigt.....	82
3.4.6	RBM47 verringert die Stabilität der p21 mRNA durch Bindung an ihre 3'UTR.....	88
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>93</b>
4.1	ERK, JNK und p38 regulieren die p21-Expression auf verschiedenen Ebenen .....	93
4.2	RBM47 reguliert den p53-p21-Signalweg durch unterschiedliche Mechanismen .....	97
4.2.1	RBM47 reguliert die p53-Expression transkriptionell und beeinflusst so die p21-Induktion und das Zellschicksal nach DNA-Schädigung .....	98
4.2.2	Im MCF-7-Zellen reguliert RBM47 die p53-Expression zusätzlich post-translational.....	101
4.2.3	RBM47 bindet die p21 mRNA 3'UTR-abhängig und verringert ihre Stabilität .....	102
4.3	Schlussfolgerung .....	108
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>109</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>111</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>129</b>
7.1	Erklärung .....	129
7.2	Publikationen .....	130
7.3	Abkürzungsverzeichnis.....	131
7.4	Danksagung .....	135

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Übersicht p53-aktivierender Stimuli und p53-regulierter zellulärer Prozesse.....	2
<b>Abbildung 2:</b> Aufbau des p53-Proteins. ....	3
<b>Abbildung 3:</b> p53 kann verschiedene Zellantworten nach DNA-Schädigung hervorrufen. ....	5
<b>Abbildung 4:</b> p53 und p16 können die Zelle in die Seneszenz führen. ....	7
<b>Abbildung 5:</b> Die Inhibition verschiedener CDKs durch p21 und p16 verhindert den Eintritt in die S-Phase. ....	8
<b>Abbildung 6:</b> Extrinsischer und intrinsischer Weg der Apoptose und die Rolle von p53. ....	10
<b>Abbildung 7:</b> Regulation von p21 durch verschiedene RBPs. ....	20
<b>Abbildung 8:</b> Aktivierung von MAPK.....	23
<b>Abbildung 9:</b> Induktion von p53 und p21 durch IR und die daraus folgende Seneszenzantwort. ....	60
<b>Abbildung 10:</b> RBM47 bindet an die p21 mRNA in Abhängigkeit von der 3'UTR. ....	61
<b>Abbildung 11:</b> Schematische Analyse der p21-Expression unter dem Einfluss von MAPK-I.....	63
<b>Abbildung 12:</b> Der ERK-Inhibitor U0126 supprimiert die bestrahlungsinduzierte p21-Proteinexpression.....	64
<b>Abbildung 13:</b> Der ERK-Inhibitor U0126 verringert die p21-Expression in Abhängigkeit vom p21-ORF. ....	65
<b>Abbildung 14:</b> Der JNK-Inhibitor SP600125 verringert die p21-Proteinexpression unabhängig von der mRNA-Expression. ....	66
<b>Abbildung 15:</b> Der JNK-Inhibitor SP600125 verändert die Expression von FLAG-p21 nicht. ....	67
<b>Abbildung 16:</b> Der p38-Inhibitor SB203580 verringert die p21-Proteinexpression und p21 mRNA-Expression.....	68
<b>Abbildung 17:</b> Der p38-Inhibitor SB203580 verringert die Expression von p21 in Abhängigkeit der p21-3'UTR. ....	69
<b>Abbildung 18:</b> Die RBM47-Proteinexpression wird nicht durch DNA-Schädigung verändert. ....	70
<b>Abbildung 19:</b> <i>Knockdown</i> von RBM47 verringert die p53- und p21-Proteinexpression nach DNA-Schädigung. ....	71
<b>Abbildung 20:</b> Die p53-Proteinexpression nach dem <i>Knockdown</i> von RBM47 ist basal und nach IR verringert. ....	71
<b>Abbildung 21:</b> RBM47 beeinflusst die Stabilität von p53 nicht. ....	73

<b>Abbildung 22:</b> Die p53 mRNA-Expression ist durch den <i>Knockdown</i> von RBM47 verringert. ....	74
<b>Abbildung 23:</b> Die p53 mRNA-Stabilität wird durch den <i>Knockdown</i> von RBM47 nicht verändert.....	75
<b>Abbildung 24:</b> RBM47 erhöht die p53-Promotoraktivität.....	75
<b>Abbildung 25:</b> Nach DNA-Schädigung ist die p21-Expression nur in HCT116 Wildtyp-, aber nicht in p53-defizienten Zellen verringert. ....	77
<b>Abbildung 26:</b> RBM47 kontrolliert die Expression von p21 und PUMA indirekt in Abhängigkeit von p53.....	78
<b>Abbildung 27:</b> RBM47 erhöht die IR-induzierte p21-Promotor-Aktivität in Abhängigkeit von p53.....	79
<b>Abbildung 28:</b> Die Transfektion mit siRBM47 verringert die Zahl seneszenten Zellen. ....	80
<b>Abbildung 29:</b> Die Transfektion mit siRBM47 verändert die PI-Aufnahme und die LDH-Aktivität nach IR in HCT116 Wildtyp-Zellen, aber nicht in p53-defizienten Zellen.....	81
<b>Abbildung 30:</b> Der <i>Knockdown</i> von RBM47 verändert die DEVDase-Aktivität nur in HCT116 Wildtyp-Zellen, nicht in p53-defizienten Zellen.....	82
<b>Abbildung 31:</b> Die Expression von p53 und p21 nimmt nach IR in UM-SCC-74A zu. ....	83
<b>Abbildung 32:</b> In UM-SCC-74A und MCF-7 ist die mRNA-Expression von p53 und seinen Zielgenen nach siRNA- <i>Knockdown</i> von RBM47 verringert. ....	84
<b>Abbildung 33:</b> In UM-SCC-74A-Zellen nimmt die p53-Proteinexpression nach <i>Knockdown</i> von RBM47 ab, in MCF-7-Zellen steigt sie jedoch an, während die p21-Proteinexpression in beiden Zelllinien supprimiert ist. ....	85
<b>Abbildung 34:</b> Der <i>Knockdown</i> von RBM47 verringert die Zahl seneszenten Zellen in UM-SCC-74A- und MCF-7-Zellen. ....	85
<b>Abbildung 35:</b> Der <i>Knockdown</i> von RBM47 erhöht die Expression von HDM2, HDMX und p53 in MCF-7-Zellen, aber nicht in HCT116 Wildtyp-Zellen. ....	87
<b>Abbildung 36:</b> Der <i>Knockdown</i> von RBM47 erhöht die p53-Proteinstabilität in MCF-7-Zellen. ....	88
<b>Abbildung 37:</b> Der <i>Knockdown</i> von RBM47 stabilisiert die p21mRNA in Abhängigkeit von p53.....	90
<b>Abbildung 38:</b> RBM47 verringert die Expression von FLAG-p21 in Abhängigkeit von der 3'UTR. ....	91
<b>Abbildung 39:</b> RBM47 verringert die p21-3'UTR-abhängige Luciferase-Aktivität .....	92
<b>Abbildung 40:</b> RBM47 reguliert den p53-p21-Signalweg transkriptionell und translational. ....	97

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Todesrezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR)- Superfamilie und ihre Liganden.....	11
<b>Tabelle 2:</b> Ausgewählte Chemikalien.....	29
<b>Tabelle 3:</b> MAPK-Inhibitoren.....	30
<b>Tabelle 4:</b> Enzyme.....	30
<b>Tabelle 5:</b> Medien.....	30
<b>Tabelle 6:</b> Zelllinien.....	30
<b>Tabelle 7:</b> TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific).....	31
<b>Tabelle 8:</b> siRNAs ON-TARGETplus siRNA.....	31
<b>Tabelle 9:</b> Primäre Antikörper.....	31
<b>Tabelle 10:</b> Sekundäre Antikörper.....	32
<b>Tabelle 11:</b> Oligonukleotide ( <i>Primer</i> ).....	32
<b>Tabelle 12:</b> Plasmid-DNA.....	32
<b>Tabelle 13:</b> Größenstandards.....	32
<b>Tabelle 14:</b> Kits.....	33
<b>Tabelle 15:</b> Geräte.....	33
<b>Tabelle 16:</b> Software.....	34
<b>Tabelle 17:</b> Passierungsverhältnisse der verwendeten Zelllinien.....	35
<b>Tabelle 18:</b> Funktion und eingesetzte Menge (pro Vertiefung einer 6-Well-Platte) der transfizierten Plasmide.....	37
<b>Tabelle 19:</b> Übersicht über die Veränderung der p21-Expression auf den verschiedenen Ebenen nach Behandlung mit dem ERK-Inhibitor U0126 (A) bzw. dem JNK-Inhibitor SP600125 (B).....	94
<b>Tabelle 20:</b> Übersicht über die Veränderung der p21-Expression auf den verschiedenen Ebenen nach Stimulation mit dem p38-Inhibitor SB203580.....	95

# 1. Einleitung

Tumorzellen besitzen essentielle Schlüsselmerkmale (*hallmarks*), welche sie während ihrer Transformation von einer normalen Zelle erwerben. Dazu zählen unter anderem das Umgehen von Wachstumssuppressoren und die Resistenz gegen den Zelltod, was zu einer unkontrollierten Zellproliferation führen kann (Hanahan & Weinberg, 2011). Gründe dafür können z.B. eine veränderte Expression oder Aktivität von Zellzyklusproteinen (Otto & Sicinski, 2017) oder die Dysregulation von DNA-Schädigungs-induzierten Signalwegen (*DNA-damage response*, DDR) (Curtin, 2012) sein. Diese Signalwege sind aktiv, um den Zellzyklus nach DNA-Schädigungen zu arretieren und Reparaturmechanismen einzuleiten. Falls der Defekt nicht reparabel ist, können terminale Zellschicksale wie Zelltod oder Seneszenz induziert werden (Visconti et al., 2016). Darüber hinaus gelingt es Tumorzellen, der Aktivierung des Signalwegs für den programmierten Zelltod, der Apoptose, zu umgehen. Dies kann durch die Generierung genetischer Mutationen oder epigenetischer Modifikationen in den Schlüsselregulatoren erfolgen (Su et al., 2015). Ein wichtiger Tumorsuppressor, der mit beiden Vorgängen assoziiert ist, ist der Transkriptionsfaktor p53. Dieser wird durch verschiedene Arten von Schädigungen, z.B. DNA-Schädigungen, aktiviert und kann durch die Induktion unterschiedlicher Zielgene, wie z.B. dem Cyclin-abhängigen Kinase (CDK: *cyclin-dependent kinase*)-Inhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (im Weiteren als p21 bezeichnet) oder dem pro-apoptotischen Protein PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*), das Fortschreiten des Zellzyklus stoppen bzw. terminale Zellschicksale einleiten.

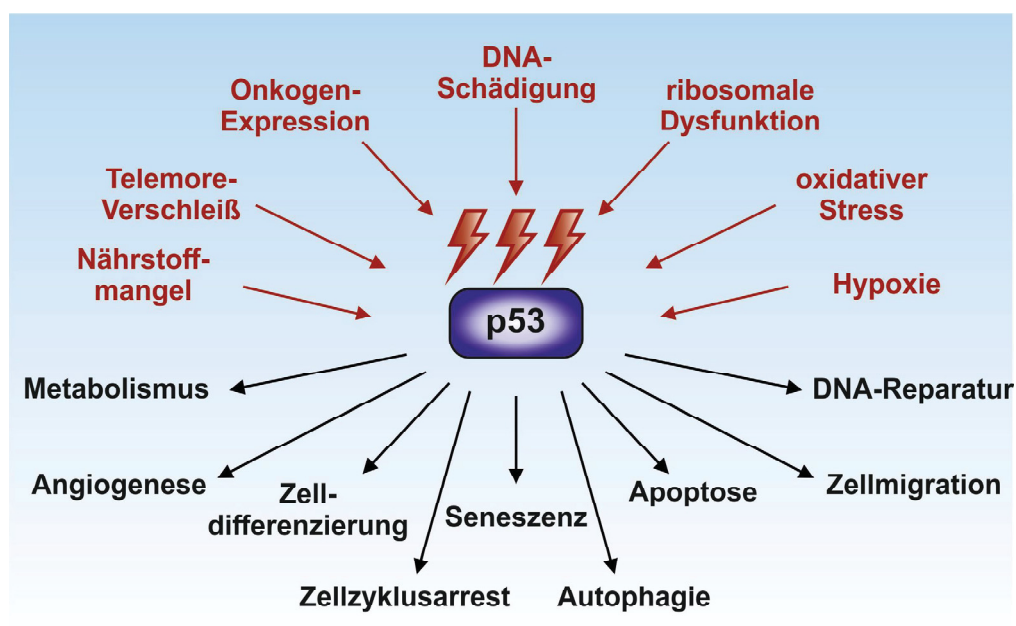
## 1.1 Tumorsuppressor p53

Das Protein p53 wurde im Jahr 1979 identifiziert und fälschlicherweise zunächst als Onkoprotein beschrieben (Lane & Crawford, 1979; Linzer & Levine, 1979). Durch darauf folgende Charakterisierungen wurde jedoch festgestellt, dass es sich bei p53 um einen Tumorsuppressor handelt, welcher der Transformation von normalen Zellen zu Tumorzellen negativ entgegen wirken kann (Baker et al., 1989; Finlay et al., 1989). Das Wildtyp-Allel des p53-Proteins besitzt kein transformierendes Potential, allerdings liegt in vielen Tumoren ein mutiertes Allel vor (Vogelstein, 1990). Nach und nach konnten die generellen Funktionen von p53 weiter aufgeklärt werden: p53 ist in der Lage, DNA sequenzspezifisch zu binden (Bargonetti et al., 1991; Kern et al., 1991) und so Transkription zu aktivieren (Farmer et al., 1992). Diese Funktion ist insbesondere nach DNA-Schädigung von Bedeutung, da p53 nach dieser stärker exprimiert wird und zu einem G<sub>1</sub>-Arrest und zur Inhibition der DNA-Synthese führt (Kastan et al., 1991). Fast 30



Jahre später sind die Aktivierung und Funktion von p53 zwar detaillierter beschrieben. Allerdings ist dieser Transkriptionsfaktor an zahlreichen äußerst diversen zellulären Prozessen beteiligt, weshalb die komplexen Mechanismen der Funktionsweise von p53 bei einigen dieser Prozesse noch nicht im Detail bekannt sind. Eine gut aufgeklärte Funktion von p53 besteht in seiner Wirkung als Tumorsuppressor, weshalb p53 als Hüter des Genoms („*Guardian of the genome*“) bezeichnet wird (Lane, 1992). Seine Hauptfunktionen bestehen zum einen in der Adaption und Reparatur von Zellen nach Stress oder Schädigungen, und zum anderen in der Elimination von Zellen, deren DNA entweder nicht repariert werden kann, oder in denen der Stimulus persistierend ist (Kruiswijk et al., 2015). In etwa 50% der humanen Tumoren liegt p53 in einer mutierten Form vor und in vielen weiteren Tumoren sind p53-Regulatoren verändert, was die besondere Bedeutung von p53 in der Verhinderung der Tumorgenese unterstreicht (Toledo & Wahl, 2006).

Die Aktivierung von p53 erfolgt durch verschiedene Stimuli wie DNA-Schädigung, Onkogen-Expression, ribosomale Dysfunktion, Telomer-Verschleiß, oxidativer Stress, Nährstoffmangel oder Hypoxie (Biegging & Attardi, 2012) (Abbildung 1). In nicht-geschädigten Zellen liegt zunächst eine niedrige Konzentration des p53-Proteins vor, da es durch die E3-Ubiquitin-Ligase HDM2 (*Human double minute 2 protein*) ubiquitiniert und in der Folge proteasomal degradiert wird. Ist die Zelle schädigenden Stimuli ausgesetzt, kommt es zu Phosphorylierungen von p53, welche die Bindung von p53 zu HDM2 inhibieren. Da so keine Degradation mehr stattfindet, reichert sich das p53-Protein in der Zelle an. Hierdurch bindet p53 spezifisch an seine Zielsequenzen in bestimmten



**Abbildung 1: Schematische Übersicht p53-aktivierender Stimuli und p53-regulierter zellulärer Prozesse**

Verschiedene Stresssignale oder zelluläre Schädigungen können p53 aktivieren (rote Pfeile), und p53 kann dann eine Vielzahl zellulärer Prozesse regulieren (schwarze Pfeile) (modifiziert nach Biegging & Attardi, 2012).



Promotoren und aktiviert seine Zielgene transkriptionell (Kastenhuber & Lowe, 2017). Mittels dieser Zielgene werden verschiedene Prozesse reguliert, wie z.B. Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur, Apoptose und Seneszenz. Darüber hinaus ist p53 aber auch an vielen weiteren zellulären Prozessen wie Autophagie, Migration, Angiogenese, Zelldifferenzierung, Stammzellreprogrammierung und Regulierung des Zellmetabolismus beteiligt (Olivos & Mayo, 2016) (Abbildung 1).

Seit Entdeckung der ersten p53 Zielproteine, wie z.B. p21 (El-Deiry et al., 1993), GADD45 (Kastan et al., 1992), und HDM2 (Wu et al., 1993), wurden eine große Zahl weitere, durch p53 aktivierte Zielgene beschrieben. Zwar ergab ein kürzlich erstellter Zensus 3661 von p53-regulierte Gene, von denen jedoch nur 343 als echte Zielgene (*high confidence targets*) eingestuft wurden (Fischer, 2017). Die Annahme, dass p53 in der Lage ist, Gene zu reprimieren (Ho & Benchimol, 2003), konnte ebenso widerlegt werden. Aktuelle Daten zeigen, dass dieser Effekt nicht direkt von p53 vermittelt wird (Fischer et al., 2016; Verfaillie et al., 2016), sondern indirekt über die Aktivierung von Transkriptions-inhibierenden Signalwegen, wie dem p21-Retinoblastoma (RB)-Signalweg (Fischer et al., 2014). Neben der Wirkungsweise als Transkriptionsfaktor besitzt p53 darüber hinaus Funktionen, die unabhängig von der Transaktivierung an der DNA sind. Wird p53 ins Zytoplasma transportiert, kann es auch dort durch Lokalisation an den Mitochondrien, wahrscheinlich im Zusammenspiel mit weiteren Mechanismen, zur Apoptose beitragen (Kapitel 1.1.2.2) oder Autophagie hemmen (Green & Kroemer, 2009). Für die beschriebenen Funktionen sind im p53-Protein verschiedene Domänen vorhanden, die spezifische Eigenschaften besitzen.

### 1.1.1 Aufbau von p53

Das humane p53 Protein besteht aus 393 Aminosäuren (AS), die in sechs funktionellen Domänen angeordnet sind (Abbildung 2). Am N-Terminus befinden sich zwei Transaktivierungsdomänen (TAD I und TAD II; AS 1-60), die für die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen benötigt werden. Auf die TADs folgt eine Prolin-reiche Region (PRR; AS 60-94), die Protein-Protein-Interaktion ermöglicht (Olsson et al., 2007). Den größten und wichtigsten Teil des Proteins nimmt die DNA-bindende Domäne (DBD, AS 94-292) ein, über die p53 spezifisch an Erkennungselemente im Promoter von Zielgenen bindet (Toledo & Wahl, 2006). Die Bedeutung dieser DNA-bindenden Domäne



Abbildung 2: Aufbau des p53-Proteins.

Detaillierte Erläuterungen sind im Kapitel 1.1.1 beschrieben. TAD: Transaktivierungsdomäne, PRR: Prolin-reiche Region; DBD: DNA-bindende Domäne; L: Linker; 4D: Tetramerisierungs-Domäne; CTD: C-terminale regulatorische Domäne; NES: nukleare Exportsequenz; NLS: nukleare Lokalisierungssequenz; AS: Aminosäure (modifiziert nach Joerger & Fersht, 2010).

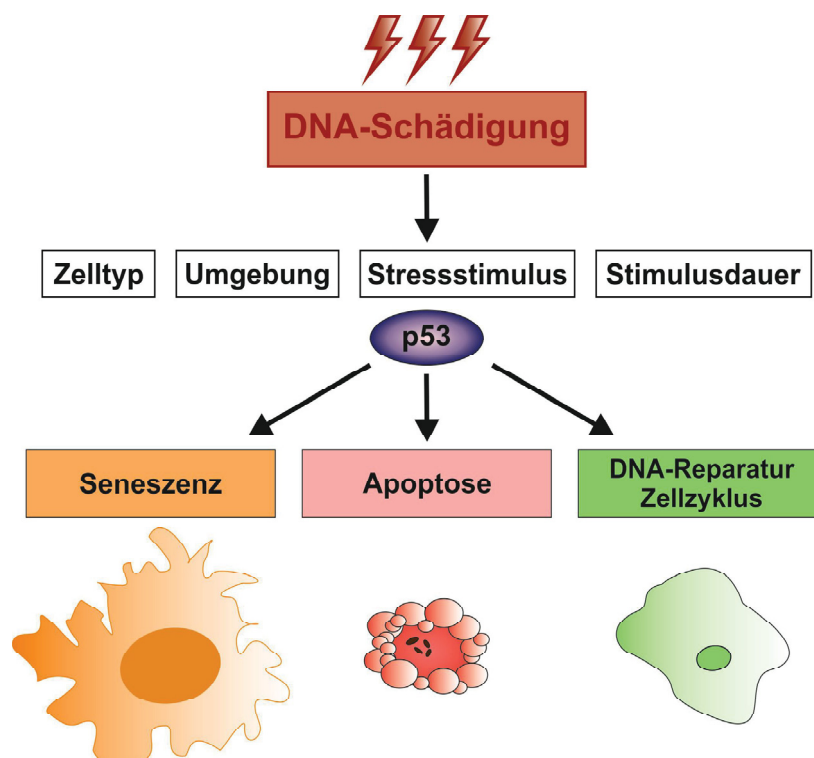
für die regulatorische Funktion von p53 wird dadurch unterstrichen, dass über 90% aller p53-Mutationen in dieser Region lokalisiert sind (Olsson et al., 2007). Die DBD ist durch einen flexiblen *Linker* (L) mit der Tetramerisierungs-Domäne (4D, AS 325-356) verbunden, an der die Oligomerisierung mit weiteren p53-Molekülen stattfindet, welche für die Aktivität des Transkriptionsfaktors obligatorisch ist. In dieser Domäne befindet sich auch eine nukleare Exportsequenz (NES). Am C-Terminus liegt eine weitere regulatorische Domäne vor (C-terminale regulatorische Domäne, CTD, AS 356-393), die vermutlich unspezifisch DNA bindet und die spezifische Bindung der DBD regulieren kann (Toledo and Wahl 2006). Sie enthält drei nukleare Lokalisierungssequenzen (NLS) (Olsson et al., 2007).

### **1.1.2 p53, der Zellzyklus und das Zellschicksal**

Der Zellzyklus wird durch zwei Faktoren gesteuert: Cycline, deren Konzentration sich in der Zelle durch Expression und Degradation in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus verändert, und Cyclin-abhängige Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDKs). CDKs werden permanent exprimiert, sind aber als Monomere inaktiv, und werden erst durch die Bindung an entsprechende Cycline aktiviert (Morgan, 1995). Durch Phosphorylierungen aktivieren oder inhibieren die CDKs-Cyclin-Komplexe zahlreiche Zielsubstrate. Diese CDK-induzierten Modifizierungen ermöglichen den Eintritt in die DNA-Synthese oder Mitose und treiben somit das Fortschreiten des Zellzyklus voran (Barnum & O'Connell, 2014). Um den Zellzyklus nach DNA-Schädigung oder vorherigen Fehlern in diesem Prozess zu unterbrechen, besitzt die Zelle mit den sogenannten Zellzyklus-*Checkpoints* ein Kontrollsystem aus komplexen Signalwegen, welches den Zellzyklus an zentralen Positionen reguliert (Malumbres & Barbacid, 2009). Durch DNA-Schädigung wird in Zellen der DDR-Signalweg ausgelöst, wodurch es zur Aktivierung von Zellzyklus-*Checkpoints* in der G<sub>1</sub> (*gap 1*)- und S (Synthese)- Phase oder G<sub>2</sub> (*gap 2*)/Mitose-Transition kommen kann (Visconti et al., 2016). Der dominante Signalweg in der G<sub>1</sub>-Phase ist der ATM/Chk2-p53/HDM2-p21 Signalweg (Kastan & Bartek, 2004), wobei die Serin/Threonin-Kinase ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) ein Sensorprotein für DNA-Doppelstrangbrüche ist. Treten diese Schädigungen in einer Zelle auf, wird ATM aktiviert, und phosphoryliert zum einen p53 an Serin15 (Banin et al., 1998), aber auch die *Checkpoint*-Kinase 2 (Chk2), welche ebenfalls zur Aktivierung von p53 durch Phosphorylierung beiträgt. Die beiden Kinasen phosphorylieren ebenso den p53-Regulator HDM2, was ebenfalls die Interaktion von HDM2 und p53 unterbindet und zu einer Stabilisierung von p53 beiträgt (Kastan & Bartek, 2004). Zusätzlich führt die Akkumulation von p53 zu einer Tetramerisierung der Proteine, welche für eine effiziente Bindung an die DNA benötigt wird (McLure & Lee, 1998). Gleichzeitig fördert dieser Prozess durch Maskierung einer NES die nukleare Lokalisation von p53 (Stommel & Wahl, 2004) und der nukleare Export, den HDM2 über

eine Monoubiquitinierung vermittelt (Li et al., 2003), wird verhindert (Horn & Vousden, 2007). So kann der Tumorsuppressor p53 transkriptionell seine Zielgene aktivieren.

Ein Zielgen von p53 ist der CDK-Inhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (El-Deiry et al., 1993; Harper et al., 1993), dessen Expression zur Inhibition von CDK-Cyclin-Komplexen führt. Dadurch wird ein Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>- oder G<sub>2</sub>-Phase induziert (Kapitel 1.2). Während dieses Arrests besteht für die Zelle die Möglichkeit, DNA-Schäden zu beseitigen, um so ihr Überleben zu sichern (Kastan & Bartek, 2004). Auch diesen Prozess unterstützt p53, da es an verschiedenen DNA-Reparatursystemen entweder als Koordinator oder sogar selbst aktiv beteiligt ist (Jänicke et al., 2008). Ist eine Reparatur der DNA auf Grund einer zu massiven Schädigung jedoch nicht mehr möglich, kommt es zu einer Induktion terminaler Zellschicksale wie der Seneszenz oder Apoptose, deren Einleitung ebenfalls von p53 kontrolliert wird. Welchen Ausgang eine p53-Aktivierung nimmt, ist abhängig verschiedenen Faktoren wie z.B. dem Zell- und Gewebetyp, der Zellumgebung, sowie der Art, Stärke und Dauer des Stresssignals (Abbildung 3) (Childs et al., 2014; Kruiswijk et al., 2015).



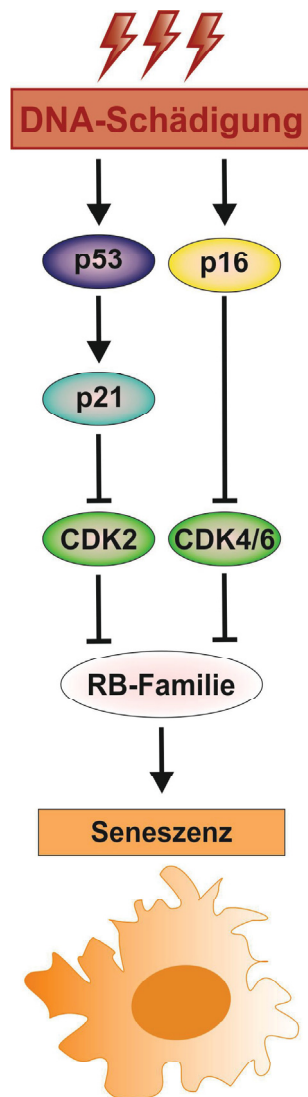
**Abbildung 3: p53 kann verschiedene Zellantworten nach DNA-Schädigung hervorrufen.**

*Nach einer DNA-Schädigung wird p53 in Abhängigkeit von Zelltyp, Zellumgebung, Art und Dauer des Stressstimulus aktiviert. Der Tumorsuppressor integriert die verschiedenen Signale und löst so eine Zellantwort aus.*

### **1.1.2.1 Die Rolle von p53 in der Seneszenz**

Ein terminales Zellschicksal, welches p53 nach seiner Aktivierung einleiten kann, ist die Seneszenz. In der Seneszenz befinden sich Zellen in einem permanenten und irreversiblen Zellzyklusarrest, sind aber weiterhin metabolisch aktiv (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Seneszente Zellen unterscheiden sich daher von ruhenden Zellen (*quiescent cell*), die sich in einem reversiblen Zellzyklusarrest befinden und unter geeigneten Bedingungen wieder proliferieren können. Terminal-differenzierte Zellen befinden sich wie seneszente Zellen in einem nicht-reversiblen Zellzyklusarrest. Jedoch geht dieser programmierte Entwicklungsprozess mit der Ausprägung funktionaler und morphologischer Eigenschaften der finalen Zellfunktion einher (He & Sharpless, 2017). Beschrieben wurde das Phänomen der Seneszenz zuerst von Hayflick und Moorhead, die zeigten, dass humane Fibroblasten in Kultur nur eine begrenzte Fähigkeit besitzen, sich zu teilen (Hayflick & Moorhead, 1961). Ursächlich für diesen Mechanismus, der als replikative Seneszenz bezeichnet wird, ist eine Verkürzung der Telomere, welche bei jeder Teilung einer Zelle auftritt. Diese Verkürzung erreicht nach einer bestimmten Anzahl von Zellverdopplungen eine kritische Grenze, wodurch eine weitere Zellteilung nicht mehr möglich ist (Hayflick-Limit) (Bodnar et al., 1998; Harley et al., 1990). Heute ist bekannt, dass Seneszenz durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden kann, zu denen die gerade beschriebene Telomer-Dysfunktion gehört, aber auch Onkogenaktivierung, oxidativer Stress, DNA-Schädigung, Mitogen-Signale und epigenetische Schäden (Campisi, 2013; Collado & Serrano, 2006).

Neben dem Wachstumsarrest zeichnet sich die Seneszenz durch weitere Merkmale aus, die sich als Marker für deren Identifikation eignen (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Da die meisten Charakteristika allerdings nicht exklusiv in seneszenten Zellen zu finden sind, ist der Nachweis mehrerer Marker erforderlich, um die Induktion dieses Zellschicksals spezifisch zu belegen (Sharpless & Sherr, 2015). Auf morphologischer Ebene kann eine vergrößerte und abgeflachte, z.T. vakuolisierte Zelle, und in manchen Fällen auch die Bildung von Mikronuklei, ein erster Hinweis auf Seneszenz sein. Auf Grund des Wachstumsarrests seneszenter Zellen lassen sich Marker der Proliferation, wie das Ki67-Protein oder die Einlagerung des Basenanalogs Bromdesoxyuridin (BrdU), nicht mehr nachweisen. Der meistgenutzte Marker ist die Aktivität der sogenannten Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal), da es durch einen vergrößerten lysosomalen Anteil in seneszenten Zellen zu einer verstärkten Expression der lysosomalen  $\beta$ -Galaktosidase kommt. Ein weiteres wichtiges Merkmal ist die erhöhte Expression verschiedener Seneszenzmediatoren. Zu diesen gehören die Proteine p53 und p21 bzw. p16<sup>INK4a</sup>, und hypophosphoryliertes Retinoblastoma-Protein (RB), welche die Hauptregulatoren der Seneszenz darstellen (Abbildung 4) (Munoz-Espin



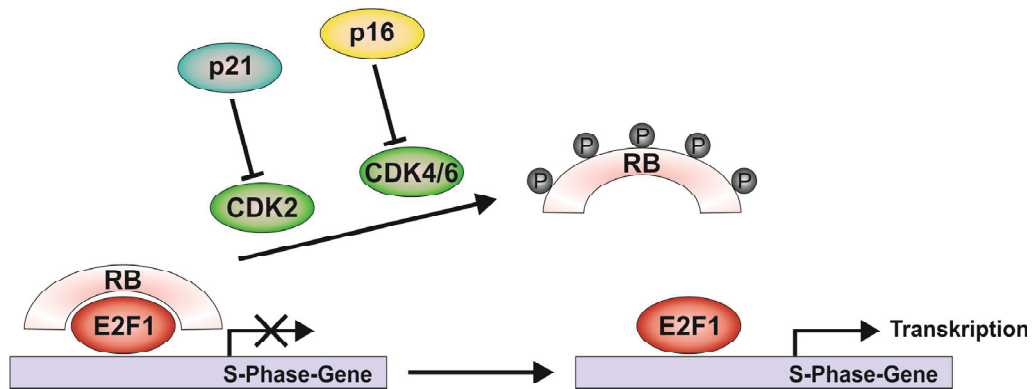
**Abbildung 4: p53 und p16 können die Zelle in die Seneszenz führen.**

Nach DNA-Schädigung kann p53 oder p16 aktiviert werden. Der Transkriptionsfaktor p53 kann den CDK-Inhibitor p21 induzieren. Sowohl p21 als auch p16 können Mitglieder der CDK-Familie inhibieren. Dadurch wird die Inaktivierung von pRB durch Phosphorylierung verhindert, sodass der Transkriptionsfaktor E2F nicht aktiv werden und Gene für Transition in die S-Phase aktivieren kann. Es kommt zum Zellzyklusarrest und zur Seneszenz (modifiziert nach Childs et al., 2015).

& Serrano, 2014). Ein Grund für die Einleitung der Seneszenz ist eine DNA-Schädigung, durch die es zur Aktivierung des DDR-Signalwegs und damit von ATM kommt, was zur bereits beschriebenen Stabilisierung von p53 führt (Kapitel 1.1.2). Dadurch wird die Expression des CDK-Inhibitors p21 erhöht, der das Fortschreiten des Zellzyklus durch Inhibition verschiedener CDK-Cyclin-Komplexe verhindert. Beispielsweise verhindert die Inhibition von CDK2 die Inaktivierung von RB zur hyperphosphorylierten Form pRB (Childs et al., 2015). RB bindet den Transkriptionsfaktor E2F1, was dessen transkriptionelle Aktivität inhibiert (Abbildung 5). E2F1 ist essentiell für die Progression des Zellzyklus, da er viele wichtige Gene, die für den Übergang von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase benötigt werden, aktiviert (Trimarchi & Lees, 2002). Durch die fehlende Phosphorylierung von RB durch CDK2 bleibt die inhibierende Bindung von RB zu E2F1 bestehen, sodass E2F1 keine Zielgene aktivieren kann und der Eintritt in die S-Phase verhindert wird (Sherr & McCormick, 2002). Alternativ kann die direkte Aktivierung von p16<sup>INK4a</sup>, bei dem es sich ebenfalls um einen CDK-Inhibitor handelt, zur Inhibition von CDK4/6-Komplexen führen. Dadurch bleibt RB ebenfalls aktiv und an E2F1 gebunden, sodass der Zellzyklus gestoppt wird. Beide Signalwege können entweder allein oder auch gemeinsam aktiviert werden (Childs et al., 2015).

Erstaunlicherweise wurde festgestellt, dass auch die replikative Seneszenz in Folge von dysfunktionalen Telomeren den DDR-Signalweg auslöst (d'Adda di Fagagna et al., 2003) und die Aktivierung von ATM, p53 und p21 benötigt (Herbig et al., 2004). Neben der Inhibition durch RB wird die Expression E2F-regulierter Genen durch die Bildung von Heterochromatinstrukturen, sogenannten Seneszenz-assoziierte Heterochromatin-Foci (SAHF), zusätzlich reprimiert. Dabei werden Heterochromatin-Proteine an die Promotoren der E2F-regulierten Gene rekrutiert, was





**Abbildung 5: Die Inhibition verschiedener CDKs durch p21 und p16 verhindert den Eintritt in die S-Phase.**

*RB inhibiert durch Bindung des Transkriptionsfaktors E2F1 die Transkription von Genen, die für den Eintritt in die S-Phase benötigt werden. Die Phosphorylierung von RB durch CDK2- oder CDK4/6-Komplexe hebt die Bindung zu E2F1 auf, sodass E2F1 transkriptionell aktiv werden kann. So können die S-Phase-Gene transkribiert werden. Die Seneszenzmediatoren p21 und p16 inhibieren die CDK-Komplexe, was die Phosphorylierung von RB verhindert und damit auch die Aktivierung von E2F1. Dies blockiert den Eintritt in die S-Phase (modifiziert nach Hamilton & Infante, 2016).*

deren Transkription und damit das Fortschreiten des Zellzyklus verhindert. SAHFs können daher ebenfalls als Marker für seneszente Zellen dienen (Narita et al., 2003).

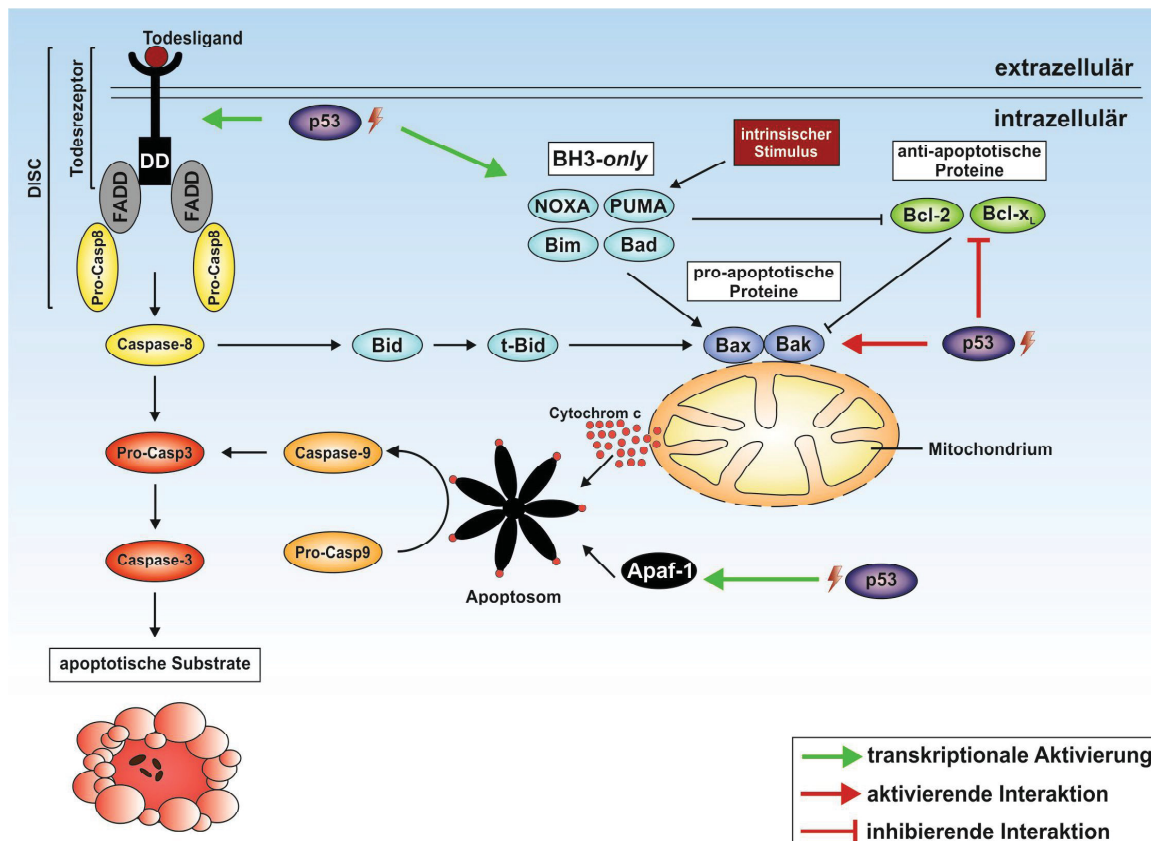
In Bezug auf Tumorentwicklung kann Seneszenz suppressive oder fördernde Effekte ausüben. Wird die Zelle einem Stimulus ausgesetzt, der die DNA schädigt und daher einen potentiellen kanzerogenen Effekt besitzt, kommt es durch die Einleitung der Seneszenz zu keiner weiteren Proliferation. Dieser intrinsische Vorgang verhindert, dass sich eine mutagene DNA-Schädigung ausbreitet und es zur Tumorbildung kommt. Die seneszente Zelle kann durch das Immunsystem eliminiert werden, sodass sich das Gewebe nach deren Entfernung regenerieren kann (Kang et al., 2011; Xue et al., 2007). Dabei werden die seneszenten Zellen entweder direkt durch das Immunsystem erkannt oder phagozytische Immunzellen werden durch die Sekretion verschiedener inflammatorischer Cytokine und Chemokine angezogen. Dieser Vorgang wird als Seneszenz-assoziiertes sekretorisches Phänotyp (SASP) bezeichnet und stellt ein weiteres Merkmal seneszenten Zellen dar (Munoz-Espin & Serrano, 2014). Tritt die Seneszenz in einem bereits vorhandenen Tumor durch einen weiteren Stressstimulus auf, kann dies sogar den Vorteil haben, dass durch die Rekrutierung des Immunsystems an den Ort des Tumors weitere Tumorzellen eliminiert werden (Childs et al., 2014). Allerdings kann sich durch den SASP auch ein chronisches-inflammatorisches Milieu ausbilden, welches nicht nur altersbedingte Krankheiten wie Arthritis oder Lungenfibrose fördert (Watanabe et al., 2017), sondern auch die Tumorentwicklung durch Anregung unkontrollierter Proliferation und Invasivität der Nachbarzellen vorantreibt (Coppe et al., 2010). Damit hat der extrinsische Vorgang der Seneszenz auch negative Auswirkungen auf die Tumorentwicklung, wenn die seneszenten Zellen nicht eliminiert werden können.

### 1.1.2.2 Die Rolle von p53 in der Apoptose

Neben der Seneszenz kann p53 ein weiteres terminales Zellschicksal einleiten, die Apoptose. Diese am besten untersuchte Form des programmierten Zelltods wurde bereits 1972 als kontrollierte und genetisch kodierte Zellauflösung beschrieben (Kerr et al., 1972). Apoptotische Zellen zeichnen sich durch verschiedene morphologische Eigenschaften aus. Nach der Kondensation von Nukleus und Zytoplasma wird sowohl der Nukleus, als auch die darin enthaltende DNA fragmentiert. Die Zellmembran bildet viele Ausstülpungen, was als *membrane blebbing* bezeichnet wird, und es kommt schlussendlich zur Bildung apoptotischer Körper (*apoptotic bodies*), die von Makrophagen phagozytiert werden. Da die apoptotischen Körper von einer intakten Membran umgeben sind, was die Freisetzung intrazellulärer Proteine verhindert, kommt es zu keiner inflammatorischen Reaktion des Immunsystems (Elmore, 2007). Um die phagozytierenden Immunzellen zu den apoptotischen Zellen zu rekrutieren, sekretieren die Zellen sogenannte *find-me*-Signale (z.B. Lysophosphatidylcholin und die Nukleotide ATP und UTP). Durch Rezeptoren auf ihrer Oberfläche erkennen die Makrophagen spezifische Marker auf apoptotischen Zellen, sogenannte *eat-me*-Signale (z.B. Phosphatidylserinexposition, Veränderungen im Glycolysierungsmuster der Zelloberfläche), die zur Phagozytose führen (Ravichandran, 2011).

Der molekulare Prozess hinter den morphologischen Veränderungen der apoptotischen Zelle wird unabhängig von dem Apoptose-induzierenden Signal durch die Proteinfamilie der Caspasen (**C**ystein-**A**spartyl-**P**roteasen) vermittelt. Diese spalten ihre Substrate nach einer Aspartat-Aminosäure, wobei deren Spezifität durch weitere Aminosäurereste im Erkennungsmotiv bestimmt wird (Elmore, 2007). Caspasen liegen als inaktive Zymogene, sogenannte Pro-Caspasen, in der Zelle vor und werden für ihre Aktivierung proteolytisch gespalten. Bei der Einleitung der Apoptose wird eine Enzymkaskade ausgelöst, in dem zunächst die sogenannten Initiator-Caspasen (Caspasen-2, -8, -9, -10) aktiviert werden. Diese versetzen durch nachfolgende proteolytische Spaltung die Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7) in einen aktiven Zustand, welche ebenfalls proteolytisch aktiv werden und zahlreiche Substrate spalten, die verantwortlich für die Zellveränderung während der Apoptose sind (Nagata, 2018; Pistrutto et al., 2016). Die Initiator-Caspasen können durch intrazelluläre oder extrazelluläre Signale aktiviert werden, weswegen zwischen dem intrinsischen und extrinsischen Signalweg der Apoptose unterschieden wird (Abbildung 6).

Intrazelluläre Signale wie DNA-Schädigung, Hypoxie, oxidativer Stress oder auch das Ausbleiben von Proliferationssignalen lösen den intrinsischen Signalweg aus, der auch als mitochondrialer Weg bezeichnet wird (Abbildung 6). Dieser wird von der Bcl-2-Proteinfamilie kontrolliert. Zentral ist die Aktivierung der pro-apoptotischen Effektor-



**Abbildung 6: Extrinsischer und intrinsischer Weg der Apoptose und die Rolle von p53.**

Detaillierte Erläuterungen sind in Kapitel 1.1.2.2 beschrieben. DISC: death induced signaling complex; DD: Death domain; FADD: Fas-associated death domain; Pro-Cas8: Pro-Caspase-8; Pro-Cas3: Pro-Caspase-3 (modifiziert nach Nagata, 2018).

Proteine (u.a. Bax, Bak), die in Abwesenheit einer Schädigung in der Zelle von den anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine (u.a. Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1) durch Interaktion inhibiert werden. Ein schädigender Stimulus induziert die als Initiatoren bezeichneten BH3-only Proteine (u.a. PUMA, NOXA, Bim, Bid, Bad), welche direkt die pro-apoptotischen Proteine aktivieren bzw. die Funktion der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine inhibieren (Czabotar et al., 2014). Die Aktivierung und Derepression von Bax und Bak führt zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP: *mitochondrial outer membrane permeabilisation*). So gelangen Moleküle wie Cytochrom c, die sonst im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert sind, in das Zytosol. Cytochrome c bindet im Zytosol Apaf-1, was in Abhängigkeit von ATP zur Bildung eines heptameren Proteinkomplexes, dem Apoptosom, führt. Die Pro-Caspase-9 bindet ebenfalls an diesen Komplex, wo sie autokatalytisch aktiviert und die aktive Form der Initiator-Caspase, Caspase-9, gebildet wird. Nachfolgend werden Effektor-Caspasen durch die proteolytische Spaltung aktiviert (Pistritto et al., 2016).

Im Gegensatz zum intrinsischen Signalweg wird der extrinsische Signalweg durch extrazelluläre Signale aktiviert. Diese werden von Todesrezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie (Tabelle 1) auf der Zelloberfläche erkannt,



Tabelle 1: Todesrezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie und ihre Liganden.

Rezeptor	Alternative Namen	Ligand	Adapterprotein
<b>Fas</b>	Fas-Rezeptor (FasR), CD95, <i>Apoptosis-antigen 1</i> (Apo-1)	FasL (Fas Ligand, CD95L)	FADD ( <i>Fas-associated death domain-containing protein</i> )
<b>TNFR1 (TNF-Rezeptor 1)</b>		TNF $\alpha$	TADD ( <i>TNFR-associated death domain-containing protein</i> )
<b>TRAILR1/2 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor-1/2)</b>	DR4/5 ( <i>death receptor 4/5</i> )	TRAIL ( <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> )	TADD

weswegen dieser Signalweg auch Todesrezeptorsignalweg genannt wird. Sie besitzen eine extrazelluläre Domäne, an die ihre entsprechenden Liganden binden können, und eine intrazelluläre Todesdomäne (DD, *death domain*) zur Protein-Protein-Interaktion für die Signalweiterleitung. Nach Aktivierung durch Liganden oligomerisieren die Rezeptoren und die intrazelluläre DDs rekrutieren Adapterproteine (FADD oder TADD), an welche die Pro-Caspase-8 bindet. Dieser Proteinkomplex aus Rezeptor, Adapter und Pro-Caspase-8 wird als DISC (*death induced signaling complex*) bezeichnet (Abbildung 6). Am DISC wird Pro-Caspase-8 autokatalytisch zu Caspase-8 aktiviert, welche Effektor-Caspasen proteolytisch spalten kann (Mcllwain et al., 2013).

Der extrinsische und intrinsische Signalweg sind jedoch nicht völlig unabhängig, sondern sie können sich auch gegenseitig beeinflussen. Um das apoptotische Signal zu verstärken, kann Caspase-8 den intrinsischen Signalweg aktivieren. Neben Caspase-3 ist Bid, ein BH-3 *only*-Protein, ein Substrat von Caspase-8, dessen Spaltung tBid (*truncated Bid*) produziert. Dieses kann im Gegensatz zu Bid an den Mitochondrien eine MOMP auslösen und so den intrinsischen Signalweg der Apoptose induzieren (Jost et al., 2009).

Sowohl im intrinsischen als auch im extrinsischen Signalweg spielt p53 eine wichtige Rolle (Abbildung 1). In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor aktiviert p53 die Expression einiger Mitglieder der Bcl-2-Familie (z.B. Bax, PUMA, NOXA) und Zelltyp-abhängig auch die mRNA-Expression der Todesrezeptoren und Apaf-1 (Haupt et al., 2003). Zusätzlich besitzt p53 allerdings auch eine Transkriptions-unabhängige Funktion in der Apoptose. So wurde eine durch Stresssignale verursachte Lokalisation von p53 an den Mitochondrien beschrieben, die zur Ausbildung des MOMP führte. Ursache hierfür ist die Interaktion von p53 mit Proteinen der Bcl-2-Familie (Vaseva & Moll, 2009). Auch wenn der vollständige Mechanismus noch nicht geklärt ist, wird vermutet, dass p53 durch Bindung an die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> deren Repression von Bax und Bak aufhebt und auf diese Weise die MOMP ausgelöst wird (Speidel, 2010). Jedoch induziert die Lokalisation von p53 an den Mitochondrien nicht immer Apoptose

(Essmann et al., 2005). Daher ist es möglich, dass die Anwesenheit von p53 zur Einleitung der MOMP an Mitochondrien zwar benötigt wird, aber noch weitere Mechanismen neben der Lokalisation die Transkriptions-unabhängige p53-Apoptosefunktion kontrollieren (Speidel, 2010).

### **1.1.3 Regulation von p53**

Die Expression, und damit meistens auch die Aktivität des Transkriptionsfaktors p53, wird vor allem auf post-translationaler Ebene bestimmt. Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, wird p53 in Abwesenheit von schädigenden Stimuli von der E3-Ubiquitinligase HDM2 für den proteasomalen Abbau markiert. Allerdings wird dieser Vorgang nicht allein von HDM2 reguliert, sondern auch das HDM2-Homolog HDMX (*human double minute X protein*, auch als HDM4 bezeichnet) spielt dabei eine Rolle. HDMX besitzt im Gegensatz zu HDM2 keine E3-Ubiquitinligase-Funktion, allerdings bindet es an der gleichen Sequenz in der p53 TAD. Darüber hinaus können beide Proteine durch ihre RING (*really interesting new gene*)-Domäne heterodimerisieren. Interessanterweise unterscheidet sich auch die Regulierung der beiden Proteine durch p53. Zwischen HDM2 und p53 gibt es einen Rückkopplungseffekt, der die p53-Expression nach einer Schädigung zeitlich begrenzt, da HDM2 ein transkriptionelles Ziel von p53 ist und daher nach einem schädigenden Stimulus hochreguliert wird. Auf Grund der erhöhten Expression ist HDM2 in der Lage, die p53-Antwort wieder abzuschwächen, was gleichzeitig auch die HDM2-Transaktivierung reprimiert (Wu et al., 1993). Im Gegensatz dazu dachte man lange Zeit, dass HDMX kein Zielgen von p53 ist. Jedoch gab es kürzlich Hinweise, dass auch das HDMX-Gen ein p53-bindendes Element in seinem Promotor besitzt. Dieser Promotor produziert jedoch ein alternatives Transkript, welches eine wichtige Rolle in der HDM2-vermittelten Reduktion der p53-Expression nach einem p53-aktivierenden Stimulus spielt (Phillips et al., 2010). Interessanterweise sind beide Proteine in Tumoren selten mutiert, allerdings oft überexprimiert, was zur Tumorbildung durch die Inaktivierung der p53-Funktion führen kann (Karni-Schmidt et al., 2016).

Derzeit existieren es zwei Modelle, wie HDM2 und HDMX die Expression und Aktivität von p53 regulieren. Im ersten Modell agieren beide Regulatoren unabhängig voneinander, in dem HDMX die Transaktivierungsfunktion von p53 durch Bindung an die TAD verhindert und HDM2 die Proteinmenge von p53 durch Ubiquitinierung reguliert. Im zweiten Modell kontrollieren HDM2 und HDMX p53 gemeinschaftlich, in dem die beiden Regulatoren ein Heterodimer bilden (Shadfan et al., 2012). Die erste Theorie der unabhängigen Funktion wird von embryonalen *Knock-Out* (KO)-Modellen unterstützt. Zwar führen sowohl der KO von *HDM2* als auch von *HDMX* zur embryonalen Letalität, jedoch sterben *HDM2*<sup>-/-</sup>-Mäuse zwischen Implantation und Tag 7,5 der Gestation (de Oca Luna et al., 1995; Jones et al., 1995), während *HDMX*<sup>-/-</sup>-Mäuse zwischen Tag 7,5

und 10,5 der embryonalen Entwicklung sterben (Migliorini et al., 2002; Parant et al., 2001). Beide letale Phänotypen können durch einen p53-KO wieder aufgehoben werden, was darauf hinweist, dass beide Proteine eine nicht-redundante Funktion besitzen. Allerdings können durch die Überexpression von HDM2 in HDMX-KO-Mäusen der letale Phänotyp ebenfalls verhindert werden. Dies deutet darauf hin, dass HDM2 in der Lage ist, die Expression von p53 auch in Abwesenheit von HDMX zu kontrollieren und beide Proteine somit überlappende Funktionen besitzen (Steinman et al., 2005). Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass HDM2 p53 effizienter ubiquitiniert, wenn es mit HDMX in einem Heterodimer vorliegt, und dass die Spaltung des Dimers zur Aktivierung von p53 *in vivo* führt (Pei et al., 2012).

Da p53 durch verschiedenste Stimuli aktiviert wird und auch gegensätzliche Prozesse beeinflusst, ist die Regulierung der spezifischen p53-Aktivität, z.B. gegenüber bestimmten Zielgenen, auf post-translationaler Ebene neben der allgemeinen Expressionskontrolle durch HDM2 und HDMX von besonderer Bedeutung. Die zelluläre Antwort, die durch die Aktivierung von p53 ausgelöst wird, ist abhängig von Gewebe, Zelltyp, Art und Dauer des Stimulus (Abbildung 3). Diese Informationen werden zum einen durch post-translationale Modifikationen (PTM) wie Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Glycolysierung, Ubiquitinierung, Neddylierung, Sumoylierung und Ribosylierung an über 50 verschiedenen Positionen vom p53-Protein weitergegeben (Meek & Anderson, 2009). Zusätzlich werden die Lokalisation von p53 und die Aktivität dessen Ko-Faktoren vom Stimulus und der Umgebung beeinflusst. Die so gesammelten Informationen aus der Menge des p53-Proteins, der PTMs, Lokalisation von p53 und Aktivität von Ko-Faktoren werden in p53 vereinigt und führen in Abhängigkeit des Stimulus zu einer Induktion einer bestimmten Gruppe von Zielgenen und einer daraus resultierenden zellulären Antwort. So kann auf eine Vielzahl von Stimuli vielfältig reagiert werden. Jede kleine Änderung der Information, wie z.B. eine andere PTM, kann die Aktivität von p53 in Bezug auf seine Zielgene verändern, was zu einer anderen, sogar entgegengesetzten zellulären Antwort führen kann (Kastenhuber & Lowe, 2017; Murray-Zmijewski et al., 2008).

Auf transkriptioneller Ebene kann die p53-Expression durch verschiedene Faktoren aktiviert werden. Der Transkriptionsfaktor c-Myc ist in der Lage, an den p53-Promotor zu binden und die p53 mRNA-Expression zu erhöhen (Reisman et al., 1993). Dabei konnte außerdem eine Korrelation zwischen der Expression des c-Myc Proteins und der p53 mRNA in B-Zell-Lymphomen festgestellt werden. Eine geringe c-Myc-Expression ging mit einer geringen p53 mRNA-Expression einher, während bei einer hohen c-Myc-Expression eine hohe p53 mRNA-Expression nachgewiesen wurden (Roy et al., 1994). Für die Transkription von p53 sind ebenfalls das *Activator protein* (AP-1)- und

das NF $\kappa$ B-Motiv im p53-Promotor essentiell, welche den Transkriptionsfaktor c-Jun bzw. den *Nuclear factor*  $\kappa$ B1 (NF $\kappa$ B1) binden können. Diese beiden Faktoren haben einen kooperativen Effekt und ihre transkriptionelle Aktivierung des p53-Promotors wird für die endogene Expression von p53 benötigt (Kirch et al., 1999). Darüber hinaus kann p53 selbst und ein weiteres Mitglied der p53-Familie, p73, den p53-Promotor nach Stimulation mit Chemotherapeutika wie Etoposid oder Adriamycin binden und die Expression von p53 aktivieren. Dies führt zu einem positiven Auto-Rückkopplungsmechanismus, der für die Zellzyklusregulation durch p53 benötigt wird (Wang & El-Deiry, 2006).

Auf translationaler Ebene wird p53 durch verschiedene RNA-bindende Proteine (RBPs) reguliert. *Ribosomal protein L26* (RPL26) und Nucleolin regulieren die Translation von p53 gemeinschaftlich. Während RPL26 die Translation von p53 nach DNA-Schädigung verstärkt, wird diese von Nucleolin inhibiert. Die beiden RBPs binden nicht nur an die gleiche Interaktionsregion der 5'- und 3'-untranslatierten Region (UTR) der p53 mRNA, sondern sie interagieren auch miteinander. Nucleolin liegt in einem Homodimer an der p53 mRNA vor, welches allerdings nach einer DNA-Schädigung durch die Bildung eines Nucleolin-RPL26-Heterodimers getrennt wird. Die Interaktion von Nucleolin und RPL26 wird für die Bindung von RPL26 zur p53 mRNA und der Induktion der p53-Expression benötigt (Chen et al., 2012; Takagi et al., 2005). Das RNA-bindende Protein Hu-antigen R (HuR) bindet die p53 mRNA in der 3'UTR nach DNA-Schädigung durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht und steigert die p53-Translation (Mazan-Mamczarz et al., 2003), was bei Überexpression von HuR in MCF-7-Zellen zu einer Zunahme der Apoptose führte (Ahuja et al., 2016). Im Gegensatz dazu sind die *RNA binding motif*-Proteine 38 und 24 (RBM38 bzw. RBM24) durch die Bindung der p53 mRNA und des Translationsinitiators eIF4E in der Lage, die p53-Translation zu inhibieren. Durch den Verlust der Expression eines der RBPs steigt die Expression von p53 an, die im Fall von RBM38 zu einer Zunahme der Seneszenz in murinen embryonalen Fibroblasten bzw. bei RBM24 zu einer erhöhten Apoptose in embryonalen Herzmuskelzellen führte (Zhang et al., 2011; Zhang et al., 2018). Auch *microRNAs* (miRNAs) spielen eine Rolle in der Regulation von p53 auf translationaler Ebene (Liu et al., 2017).

## 1.2 Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor p21

Der Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup> wurde 1993 als Zielgen von p53 beschrieben (El-Deiry et al., 1993) und ist in der Lage, Cyclin-abhängige Kinasen zu inhibieren (Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993). Mit p27 und p57 gehört p21 zur Familie der CIP (*CDK-interacting protein*)/KIP (*kinase-inhibitory protein*)-Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren. Die Expression von p21 kann durch verschiedene Stimuli wie DNA-Schädigung, oxidativen Stress, Cytokine oder gegen Krebszellen gerichtete Wirkstoffe

induziert werden und hat Einfluss auf verschiedene Prozesse wie Gentranskription, DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest, Differenzierung, Seneszenz und Apoptose (Abbas & Dutta, 2009). In seiner Funktion als CDK-Inhibitor (CDK-I) besitzt p21 vor allem Zellzyklus-inhibierende, und damit tumorsuppressive Eigenschaften. Allerdings wurden auch anti-apoptotische, und damit potentiell onkogene Eigenschaften beschrieben, die von der zellulären Lokalisation von p21 abhängen. So ist die Lokalisation im Nukleus verantwortlich für die Zellzyklus-inhibierenden Eigenschaften, während das Vorhandensein im Zytosol zu anti-apoptotische Effekten führt (Jänicke et al., 2007).

Der zytostatische Effekt von p21 im Nukleus beruht zum einen auf der inhibierenden Interaktion mit CDK-Cyclin-Komplexen, was zu einem Zellzyklusarrest führt (Xiong et al., 1993). Die Inhibition von CDK4/6-CyclinD und CDK2-CyclinE durch p21 führt zu einem G<sub>1</sub>-Arrest, da so die Phosphorylierung von RB und damit die Aktivität von E2F verhindert wird (Child & Mann, 2006; Jung et al., 2010) (Kapitel 1.1.2.1). Darüber hinaus interagiert p21 mit CDK2-CyclinA, CDK1-CyclinA und CDK1-CyclinB, was zu einem S bzw. G<sub>2</sub>-Arrest führen kann (Baus et al., 2003; Bunz et al., 1998; Dulić et al., 1998). Unter bestimmten Bedingungen kann dieser Arrest permanent und irreversibel werden, was bedeutet, dass sich die Zellen in der Seneszenz befinden (Kapitel 1.1.2.1). Obwohl p21 einen inhibierenden Effekt auf den CDK4/6-CyclinD-Komplex besitzt, trägt der CDK-I in Abhängigkeit von seiner Konzentration auch zu dessen Komplex-Assemblierung im Zytosol bei. Nach Lokalisation in den Nukleus kann der Komplex einen proliferierenden Effekt haben (Parry et al., 1999). Somit kann dieser CDK-I sowohl einen inhibierenden, als auch einen aktivierenden Einfluss auf diesen Proteinkomplex ausüben, abhängig davon, wie stark p21 exprimiert wird. Durch seine Interaktion mit PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), welcher zur Rekrutierung der DNA-Polymerase  $\delta$  und  $\epsilon$  in der DNA-Replikation benötigt wird, trägt p21 ebenfalls zur Inhibition des Zellzyklus bei. Die Bindungsstelle von PCNA mit DNA-Polymerasen wird von p21 maskiert, sodass die DNA-Polymerasen nicht mehr rekrutiert werden können und keine DNA-Synthese mehr stattfinden kann (Flores-Rozas et al., 1994; Waga et al., 1994). Unabhängig von der Bindung von CDK-Cyclin-Komplexen und PCNA interagiert p21 auch direkt mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren (E2F, c-Myc, *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3), NF $\kappa$ B, p300/*CREB-binding protein*) und beeinflusst so die Genexpression (Jänicke et al., 2007).

Der anti-apoptotische Effekt von p21 wird durch die Inhibition von Caspasen vermittelt. Die Initiator-Caspasen-8 und -10 (Xu & El-Deiry, 2000) und die *Apoptosis signal-regulating-Kinase 1* (ASK1), ebenfalls ein Mediator der Apoptose, werden durch p21 inhibiert (Asada et al., 1999). Außerdem verhindert p21 nicht nur die Aktivierung der Caspase-9 in Abhängigkeit von seiner CDK-I-Funktion (Sohn et al., 2006), es verhindert



auch die Fas-vermittelte Apoptose durch Inhibition der Pro-Caspase-3 (Suzuki et al., 1998). Der CDK-I p21 ist aber auch ein Substrat von Caspase-3, sodass durch die Spaltung von p21 anstatt des Zellzyklus-Arrests Apoptose eingeleitet werden kann (Zhang et al., 1999). Da p21 verschiedene und auch widersprüchliche Effekte vermittelt, ist seine Funktionen abhängig vom Zellkontext und Stimulus, weshalb seine Expression streng reguliert werden muss (Jung et al., 2010).

### **1.2.1 Regulation von p21**

Da p21 diverse und gegensätzliche Funktionen ausübt und sowohl den Zellzyklus, als auch irreversible Zellschicksale wie Apoptose und Seneszenz als wichtiger Mediator beeinflusst, ist es von großer Bedeutung, dass seine Expression auf allen möglichen Ebenen, d.h. transkriptionell, translational und post-translational kontrolliert wird. Auf transkriptioneller Ebene wird *CDKN1A*, das für p21 kodierende Gen, vor allem durch p53 nach verschiedenen Stimuli aktiviert (Kapitel 1.1). Allerdings gibt es auch weitere Transkriptionsfaktoren, welche p53-unabhängig die Expression von p21 kontrollieren. Hierzu gehören z.B. *Activator Protein 2 (AP-2)*, E2F, STAT1 und STAT3, *CCAAT/enhancer binding protein- $\alpha$  und  $\beta$*  (Gartel & Tyner, 1999). Die post-translationale Regulation spielt ebenfalls eine große Rolle. Die Halbwertszeit des p21-Proteins ist in der Regel sehr gering und liegt bei ca. 20-60 min (Abbas & Dutta, 2009). Es kann sowohl durch Ubiquitin-Ligasen für den Abbau markiert oder direkt durch das Proteasom degradiert werden (Jung et al., 2010). Zur Induktion und Stabilisation des p21-Proteins nach der Stimulation mit ionisierender Strahlung wird daher Wisp39 (*WAF-1/CIP-1 stabilizing protein 39*) benötigt, welches den *Heat shock*-Protein 90 (Hsp90)-Chaperon-Komplex rekrutiert, der p21 vor der Degradation schützt (Jascur et al., 2005).

Post-translationale Modifikationen spielen ebenfalls eine Rolle bei der Stabilisation, Lokalisation und damit Funktion des p21-Proteins. So wird p21 z.B. durch Akt, Proteinkinase C, Glykogensynthase-Kinase  $\beta$ , p38 $\alpha$  und die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) phosphoryliert. Die Phosphorylierung an Threonin145 durch Akt verhindert die Interaktion von p21 mit PCNA, sodass die DNA-Synthese stattfinden kann (Rössig et al., 2001). Außerdem führt diese post-translationale Modifikation zur zytoplasmatischen Lokalisation von p21 (Zhou et al., 2001), was mit einer schlechten Prognose für Brustkrebspatienten assoziiert ist (Xia et al., 2004). Da p21 im Zytosol durch die Inhibition von Caspasen anti-apoptotische Funktionen besitzt, könnte diese Phosphorylierung die Regulation des Zellschicksals vom Zellzyklusarrest zur Proliferation verschieben (Child & Mann, 2006). Erstaunlicherweise kann eine Phosphorylierung an derselben Stelle unter verschiedenen Bedingungen durch andere Kinasen gegensätzliche Effekte haben. So führte eine Phosphorylierung von Serin130 durch p38 und JNK zu einer erhöhten Stabilität des Proteins, um nach einem schädigenden Stimulus, der die MAPK aktiviert,

einen Zellzyklusarrest einleiten zu können (Kapitel 1.4.4). Im Gegensatz dazu wird das p21-Protein durch eine Phosphorylierung von CDK2 destabilisiert (Child & Mann, 2006). Dieser Mechanismus bietet eine weitere Möglichkeit der Rückkopplung, um die Expression von p21 in ungeschädigten Zellen gering zu halten und die Funktion von CDK2, und damit das Voranschreiten des Zellzyklus, zu erhalten (Zhu et al., 2005).

Auf translationaler Ebene wird die Expression von p21 durch verschiedene miRNAs und RNA-bindende Proteine (RBPs) reguliert. Dabei wird die p21 mRNA an ihrer 3'-untranslatierten Region u.a. von den miRNAs miR-17, -20a, -93, -106a, -106b gebunden und dadurch ihre Translationsrate direkt verringert (Fontana et al., 2008; Ivanovska et al., 2008; Kim et al., 2009; Li et al., 2009; Petrocca et al., 2008; Sokolova et al., 2015). Eine indirekte Regulation findet allerdings auch über die Reduzierung der p53 mRNA-Expression durch miRNAs statt, was dem entsprechend eine geringere p21-Induktion zur Folge hat (Zhang et al., 2009). Die ebenfalls sehr komplexe Regulation durch RBPs wird in Kapitel 1.3.2 näher beschrieben.

## 1.3 RNA-bindende Proteine

### 1.3.1 Aufbau und Funktion von RBPs

Post-transkriptionelle Genregulation ist ein effizienter Prozess, um das Proteom einer Zelle an eine sich wandelnde Umgebung anzupassen. RNA-bindende Proteine (RBPs) spielen in diesem Prozess neben miRNAs eine große Rolle. RNAs liegen in einer Zelle in der Regel gebunden durch RBPs in Ribo-Nukleo-Protein-(RNP) Komplexen vor. RBPs binden alle Arten RNAs, also neben *messenger*-RNAs (mRNAs) auch nicht-codierende RNAs (ncRNAs) wie miRNAs oder *long-non-coding* RNAs (lncRNAs) und regulieren alle Schritte der RNA-Biogenese (Glisovic et al., 2008). RNPs sind dynamische Einheiten, in denen verschiedene RBPs zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in anderen Zellkompartimenten mit RNAs assoziieren und diese so zeit- und ortsabhängig regulieren. Darüber hinaus können von RBPs auch weitere Faktoren und Enzyme in die RNPs rekrutiert werden, um die Funktionen der RNPs zu erweitern (Wurth, 2012). Bisher wurden 1542 RBPs identifiziert, was einem Anteil von 7,5% aller bekannten Proteinkodierender Gene entspricht. Dass die RBPs aber etwa 20% des exprimierten Transkriptoms ausmachen, zeigt die Bedeutung, die sie in der post-transkriptionellen Genregulation spielen. Etwa 50% der RBPs (692 RBPs) sind *messenger*-RNA-bindende Proteine (mRBPs) (Gerstberger et al., 2014). Nach der Transkription werden mRNAs verschiedenen Prozessierungsschritten unterzogen (u.a. Polyadenylierung an der 3'-untranslatierten Region (UTR), 5'UTR *capping*, *pre-mRNA-Splicing*, *RNA-Editing*). Neben diesen werden auch alle weiteren Schritte und Funktionen im sogenannten

„Lebenszyklus“ der mRNAs wie Translation, Stabilität, Transport und Lokalisation, bis hin zur Degradation von RBPs begleitet. Dabei binden einige RBPs die mRNAs nur vorübergehend, andere über den gesamten Lebenszyklus von der Transkription bis zum Abbau. Da die Prozessierung der mRNAs in verschiedenen Zellkompartimenten stattfindet, ist auch die Lokalisation der RBPs von großer Bedeutung. Viele RBPs können sich, mit und ohne RNAs, zwischen verschiedenen Zellkompartimenten wie z.B. Kern und Zytosol bewegen (Coppin et al., 2018). Alle Schritte des mRNA-Lebenszyklus sind miteinander verbunden, sodass eine mRNA von vielen verschiedenen RBPs gebunden wird und ein mRBP hunderte oder tausende mRNA binden kann (Müller-McNicoll & Neugebauer, 2013). Dabei können verschiedene RBPs an einzelnen mRNAs kooperative, aber auch gegenläufige Funktionen besitzen.

Typischerweise binden RBPs mRNAs in den untranslatierten Regionen (5'UTR oder 3'UTR), können aber auch im offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) binden. Diese Bindung wird durch RNA-bindende Domänen (RBDs) vermittelt, von denen 600 als strukturell eindeutig identifiziert werden konnten (Gerstberger et al., 2014). Zu den am häufigsten vorkommenden RBDs gehören das *RNA-recognition motif* (RRM), die *K-homology*-Domäne (KH-Domäne) und die Zink-Finger (ZF)-Domäne. Die RRM, die am besten charakterisierte RBD, besteht aus 80-90 Aminosäuren und bindet an die RNA über die Oberfläche von  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Da die RNA-Bindestelle einer RRM typischerweise aus vier bis acht Nukleotiden in der mRNA besteht, ist diese Anzahl zu klein, um eine eindeutige Bindungssequenz zu definieren. Daher besitzen RBPs für gewöhnlich mehrere dieser Domänen, um die nötige Sequenzspezifität zu erreichen. Die KH-Domäne besteht aus ca. 70 Aminosäuren und besitzt eine wichtige Signatursequenz, welche für die Bindung an RNAs benötigt wird. Jedoch interagiert die KH-Domäne nicht ausschließlich mit RNA, sondern auch mit einzelsträngiger DNA. Da diese Domäne keine aromatischen Aminosäurereste besitzt, findet die Assoziation über Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Wechselwirkungen oder Form-Komplementarität statt. Die Zink-Finger-Domäne kann in Abhängigkeit von der strukturellen Anordnung der Domänen sowohl DNA, als auch RNA binden, und kann deswegen häufig auch in Transkriptionsfaktoren vorgefunden werden. Diese Domänen zeichnen sich durch ihre Koordination eines Zink-Ions aus und liegen in einem Protein typischerweise in mehreren Wiederholungen vor. Durch die Kombinationen mehrerer gleicher oder auch unterschiedlicher Arten der RBD (z.B. RRM, KH, ZF) kann eine hohe Spezifität in der RNA-Bindung erreicht werden. Allerdings beeinflussen auch verschiedene *Linker*, die die RBDs verbinden und sehr starr oder beweglich sein können, die Spezifität. Durch die Zusammensetzung des RBPs aus verschiedenen Domänen und *Linkern* kann so auch die RNA-Struktur durch die Bindung an ein RBP verändert werden.



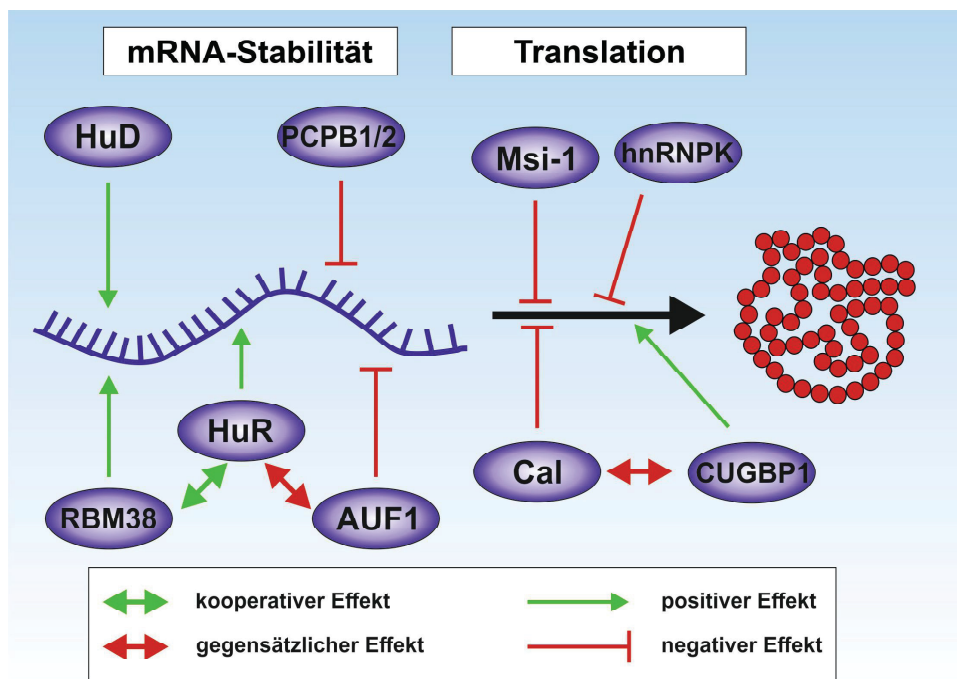
Darüber hinaus können die RBDs in einem RBP auch mit enzymatischen Domänen kombiniert werden, deren Aktivität in der Abhängigkeit von der RNA-Bindung reguliert werden kann, wodurch die Funktionalität des RBPs weiter erhöht wird (Lunde et al., 2007).

Es ist bekannt, dass viele RBPs in Krebszellen im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen in unterschiedlichen Mengen exprimiert werden und eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielen und damit in Korrelation zur Prognose der Patienten stehen (Wurth, 2012). Zwar kommt es durch die modifizierte Expression der RBPs oft nur zu geringen Änderungen in der Expression der regulierten mRNAs. Dies kann allerdings einen großen Effekt auf die nachfolgenden regulatorischen Netzwerke bewirken. Dabei beeinflussen die RBPs auf verschiedene Weise ihre Ziel-mRNAs, da sie die Stabilität, die Lokalisation, das *Splicing*-Schema oder die Translationseffizienz verändern können. Dies kann zu einer erhöhten Proliferation führen, Apoptose inhibieren oder die Invasivität von Zellen fördern (Pereira et al., 2017). Beispielsweise trägt die Überexpression der RNA-bindenden Proteine Mushashi-1 und -2 in primären Zellen und in Maus-Xenograft-Modellen zur Tumorgenese bei. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde in Tumorproben von Darmkrebspatienten eine höhere Menge an Musashi-1 (Msi-1) im carcinogenen Gewebe gefunden, als im Vergleich zum gesunden Gewebe. HuR, welches mit vielen mRNAs anti-apoptotischer Proteine interagiert, und LIN28 sind ebenfalls in Tumoren erhöht exprimiert, was im Fall von LIN28 auch mit einem invasiven Tumortyp korreliert (Chatterji & Rustgi, 2018).

### **1.3.2 Regulation von p21 durch RBPs**

Die Expression von p21 wird auf translationaler Ebene von verschiedenen RBPs reguliert, indem sie die Stabilität des Transkripts verändern oder Einfluss auf die Translation besitzen (Abbildung 7). Aus der ELAVL (*embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila like*)-Protein-Familie binden sowohl HuD (Hu-antigen D), als auch HuR an die 3'UTR der p21 mRNA (Joseph et al., 1998; Wang et al., 2000). Nach Behandlung mit UV-C-Strahlung nimmt die Lokalisation von HuR im Zytoplasma zu und stabilisiert die p21 mRNA (Wang et al., 2000), was die Bedeutung der zellulären Lokalisation eines RBPs in der Regulierung von Transkripten unterstreicht. RBM38 (auch RNPC1 genannt) stabilisiert ebenfalls die p21 mRNA in Abhängigkeit von der 3'UTR (Shu et al., 2006). Interessanterweise wurde in früheren Studien gezeigt, dass HuR und RBM38 in der Regulierung des p21-Transkripts kooperativ wirken. Die beiden RBPs binden nicht nur die p21 mRNA, sondern interagieren auch gegenseitig, indem RBM38 die Anlagerung von HuR an die p21 mRNA erhöht (Cho et al., 2010). Im Gegensatz dazu verringert AUF1 (*AU-Rich Element RNA-Binding Protein*, auch hnRNP D [*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D*]) 3'UTR-abhängig die Stabilität der p21 mRNA. Erstaunlicherweise

besitzen HuR und AUF1 gemeinsame Bindestellen an der p21 mRNA, an der eine kompetitive Bindung der beiden RBPs stattfindet und so die p21 mRNA in Abhängigkeit der Anwesenheit der beiden Proteine reguliert wird (Lal et al., 2004). PCBP1 (Poly-C-binding protein 1, auch hnRNPE1 oder CP1) assoziiert ebenfalls an die 3'UTR der p21 mRNA (Giles et al., 2003). Allerdings scheint es nur gemeinsam mit einem weiteren Familienmitglied der Poly-C-bindenden Proteine, PCBP2 (auch hnRNPE2), die Halbwertszeit der p21 mRNA zu verringern und so Einfluss auf den Zellzyklus zu haben (Waggoner et al., 2009). Auch hnRNPK und Msi-1 interagieren mit der p21 mRNA 3'UTR, allerdings verändern sie nicht die Stabilität des Transkripts, sondern reprimieren die Translation von p21 (Battelli et al., 2006; Yano et al., 2005). Calreticulin (Cal) reduziert ebenfalls die Translation von p21, aber hier findet die Bindung des RBPs an die mRNA von p21 nicht an der 3'UTR, sondern an der 5'UTR statt. Allerdings bindet CUGBP1 (*CUG triplet repeat RNA-binding protein*) kompetitiv an dieselbe Sequenz in der 5'UTR, wodurch die Translationsrate erhöht wird und damit einen entgegengesetzten Effekt zu der Interaktion von Calreticulin mit der p21 mRNA hat (Iakova et al., 2004).



**Abbildung 7: Regulation von p21 durch verschiedene RBPs.**

Die Stabilität der p21 mRNA und deren Translation wird durch verschiedene RBPs positiv (grüner Pfeil) und negativ (roter Pfeil) reguliert. Dabei können die RBPs RBM38 und HuR kooperative Effekte (grüner Doppelpfeil) und die RBPs HuR und AUF1 bzw. Calreticulin (Cal) und CUGBP1 gegensätzliche Effekte haben.

### 1.3.3 RBM47

RBM47 (*RNA binding motif protein 47*) ist ein kürzlich identifiziertes 64 kDa großes RNA-bindendes Protein mit drei RRM, das spezifisch RNA, aber keine einzelsträngige DNA bindet (Guan et al., 2013). Die Bindung an die mRNA findet vor allem an der 3'UTR, aber auch an Introns statt (Vanharanta et al., 2014), wobei ein eindeutiges Bindungsmotiv

bisher nicht identifiziert wurde. Während eine Studie eine vage Poly-U-Sequenz ermittelte (Vanharanta et al., 2014), wurden in zwei weiteren Studien zwar spezifische Motive bestimmt, welche allerdings andere Nukleotid-Abfolgen besitzen. Zum einen wurde eine GAUGAU-Sequenz beschrieben (Ray et al., 2013), aber auch eine (U)GCAUG-Sequenz (Kim et al., 2019), was auf die unterschiedlichen verwendeten Zellsystemen (humane Zellen bzw. Frosch- und Huhn-Zellen) zurück zu führen sein könnte. RBM47 lokalisiert vornehmlich im Nukleus, es konnte aber auch im Zytoplasma nachgewiesen werden (Fossat et al., 2014; Guan et al., 2013; Sakurai et al., 2016). Es ist ein Homolog von hnRNPQ, welches mit RNA-*Splicing* und –Stabilität assoziiert ist. So konnte auch für RBM47 gezeigt werden, dass es *Splicing* von 84 Genen beeinflusst und es dabei sowohl zur Inklusion als auch Exklusion von Kassetten-Exons kommt (Vanharanta et al., 2014). Außerdem beeinflusst RBM47 die Stabilität seiner Zieltranskripte. So wird die DDK1 (*Dickkopf-related protein 1*) mRNA an der 3'UTR durch RBM47 gebunden und die Stabilität dieses Transkripts durch den Schutz vor destabilisierenden Faktoren (z.B. miRNAs) erhöht (Vanharanta et al., 2014). Andererseits kann RBM47 aber auch destabilisierend wirken, wie z.B. auf die Interleukin-10 (IL-10) mRNA durch Bindung an AU-reichen Elemente (AREs) in IL-10 produzierenden B-Zellen (Wei et al., 2018). Insgesamt konnten ~2500 Ziel-mRNAs von RBM47 identifiziert werden. Jedoch ist nur eine Teilmenge mit einer Veränderung des mRNA-Levels oder alternativem *Splicing* assoziiert, sodass RBM47 höchstwahrscheinlich noch an weiteren Transkript-Regulationsmechanismen beteiligt ist, wie z.B. Relokalisation oder *C-to-U-Editing* (Vanharanta et al., 2014), wovon letzteres auch schon beschrieben wurde (Fossat et al., 2014; Kim et al., 2019).

*C-to-U-Editing* ist ein Prozess, in dem die RNA-Sequenz durch APOBEC1 als katalytische Einheit und dem Co-Faktor A1CF (*APOBEC1 complementation factor*) verändert wird, was die Möglichkeit bietet, verschiedene Proteinprodukte von einer mRNA zu translatieren (Blanc & Davidson, 2003). Mit RBM47 wurde ein Homolog von A1CF identifiziert, welches mit A1CF eine Übereinstimmung in der Gesamtproteinsequenz von 47,9% und sogar von 74,9% in den RRM's aufweist. RBM47 ko-lokalisiert darüber hinaus mit APOBEC-1 und A1CF und bindet die ApoB mRNA, welche die Modell-RNA zur Untersuchung von *C-to-U-Editing* darstellt (Fossat et al., 2014). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass RBM47 essentiell für den *Editing*-Prozess *in vivo* ist, da es durch eine RBM47-Defizienz in Mäusen zu einer Veränderung des *Editing*-Musters kam (Blanc et al., 2019; Fossat et al., 2014). Ein gemeinsamer KO von RBM47 mit A1CF führte im Vergleich zu den Einzel-KOs zu verschiedenen *Editing*-Mustern in Mäuse-Leber und –Darm, sodass RBM47 A1CF vermutlich substituieren kann, aber beide Proteine

auch unabhängige Funktionen besitzen, aber auch gewebespezifisch miteinander interagieren können (Blanc et al., 2019).

Dass RBM47 wichtige regulatorische Prozesse beeinflusst, zeigen die Konsequenzen eines *Knockdowns* für die embryonale Entwicklung. Während der Zebrafisch-Embryogenese ist RBM47 ubiquitär vom Einzellstadium bis 24h nach der Fertilisation exprimiert und reguliert die Kopf-Entwicklung, vermutlich über den Wnt8a-Signalweg. Die Reduktion der RBM47-Expression durch Morpholinos führte zu Defekten in der anterioren Kopfbildung, welche durch die Inhibition von Wnt8a wiederhergestellt werden konnten (Guan et al., 2013). Auch in der murinen Embryogenese spielt RBM47 eine Rolle. Ein Großteil homozygoter RBM47-KO-Mäuse starb bereits zwischen Tag 10 und 11 der embryonalen Gestation, sodass nur 4,7% statt 25% der Nachkommen aus einer Kreuzung heterozyotger RBM47-KO-Mäuse überleben. Darüber hinaus sind die überlebenden Mäuse kleiner als Wildtyp-Mäuse und dieses Defizit wird auch während der gesamten Lebenszeit nicht ausgeglichen (Fossat et al., 2016).

In der Tumorgenese ist RBM47 ebenfalls von großer Bedeutung. Eine hohe Expression von RBM47 ist assoziiert mit einer guten Prognose für Krebspatienten mit Brust-, Lungen- und kolorektalen Karzinomen (CRC: *colorectal carcinoma*) (Sakurai et al., 2016). In Übereinstimmung damit ist eine Verringerung der RBM47-Expression assoziiert mit epithelialer-mesenchymaler Transformation (EMT) und Metastasierung. Es konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der RBM47-Expression in Patientenproben und EMT-Modellen in Zellkultur zu einer erhöhten Zellmigration, Invasion und Metastasierung führt, und RBM47 zur Erhaltung des epithelialen Zustands benötigt wird. So kann RBM47 als Suppressor von Metastasierung angesehen werden (Rokavec et al., 2017; Vanharanta et al., 2014). Darüber hinaus konnte bereits in primären Tumoren von Brustkrebs- und CRC-Patienten eine verringerte Expression von RBM47 festgestellt werden, was nahe legt, dass diese Zellen dadurch besonders anfällig für Metastasierung sind (Budinska et al., 2013; Vanharanta et al., 2014). Ein Mechanismus, wie die Expression von RBM47 zum Schutz vor Tumorprogression und Metastasierung beitragen könnte, ist Alternatives *Splicing* durch In- und Exklusion von Kassetten-Exons. In EMT-Modellen konnte gezeigt werden, dass RBM47 43 *Splicing*-Ereignisse reguliert, die sich während des EMT verändern (Yang et al., 2016). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass RBM47 das *Splicing* von TJP1 (*tight junction protein 1*) durch die Inklusion von Exon 20 beeinflusst und so Zellmigration –und damit EMT- entgegenwirkt (Kim et al., 2019). Auch die Regulation der mRNA-Stabilität durch RBM47 könnte eine Rolle bei der Tumorsuppression spielen, da RBM47 durch beschriebene Erhöhung der Stabilität der DDK1 mRNA das cancerogene Potential der Zelle verringert (Vanharanta et al., 2014).

## 1.4 MAPK

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) sind eine Familie signaltransduzierender Enzyme, die in Eukaryoten hochkonserviert sind und viele verschiedene Funktionen auf zellulärer Ebene regulieren, wie z.B. Genexpression, Metabolismus, Mitose und Apoptose. Durch einen externen Stimulus wird eine dreistufige MAPK-Kaskade initiiert (Abbildung 8): Zunächst wird eine MAPK-Kinase-Kinase (MKKK) phosphoryliert, die dann eine MAPK-Kinase (MKK) aktiviert. Durch die MAPKK wird die MAPK ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert, die daraufhin Serine und Threonine ihrer Substrate phosphoryliert, zu denen Kinasen (MAPKAPK: MAPK-aktivierte Proteinkinase), Phospholipasen, Transkriptionsfaktoren oder Proteine des Zytoskeletts gehören (Johnson & Lapadat, 2002). Es gibt drei klassische Hauptgruppen von MAPK: *Extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK1/2; ERK1 und ERK2; im Weiteren als ERK bezeichnet), c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK; JNK1, JNK2, JNK3) und p38-MAPK ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ). Diese besitzen in ihrer Kinase-Domäne ein konserviertes Phosphorylierungsmotiv, welches durch die MAPKKs phosphoryliert wird. Dieses Motiv besteht aus drei Aminosäuren, wobei Threonin und Tyrosin bei allen Gruppen vorkommen (Thr-X-Tyr), die zweite Aminosäure jedoch

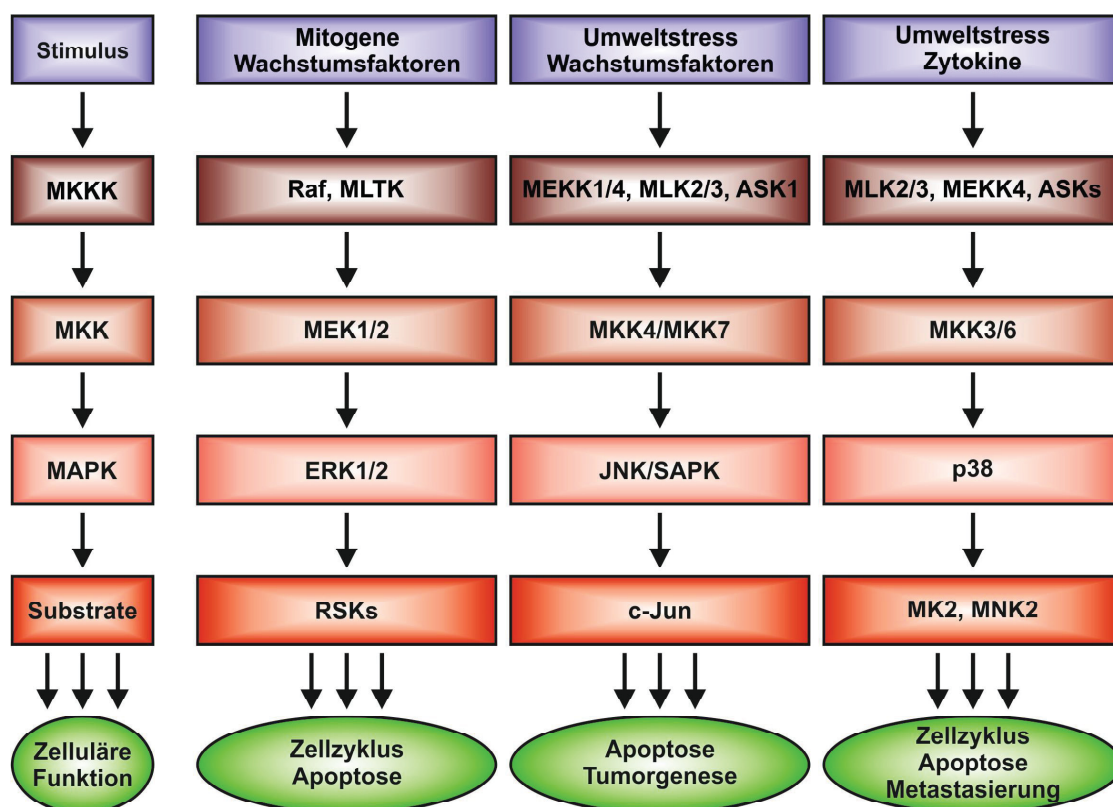


Abbildung 8: Aktivierung von MAPK

Durch einen äußeren Stimulus wird eine MAPK-Kaskade ausgelöst. Zunächst wird eine MAPK-Kinase-Kinase (MKKK) aktiviert, welche eine MAPK-Kinase (MKK) phosphoryliert. Diese aktiviert die MAPK an ihrem typischen Phosphorylierungsmotiv. Durch die Phosphorylierung verschiedener Substrate werden zelluläre Funktionen moduliert. Es sind beispielhafte Stimuli, MKKKs, MKKs, Substrate und zelluläre Funktionen dargestellt (modifiziert nach Morrison, 2012).



unterschiedlich ist. Neben diesen MAPKs gibt es noch andere, nicht so gut charakterisierte MAPK, die neben der Kinasedomäne eine weitere Proteindomäne (wie z.B. ERK5) oder ein alternatives Phosphorylierungsmotiv (z.B. ERK3, ERK4, *Nemo-like kinase* aufweisen (Cargnello & Roux, 2011). Die MAPKs werden von verschiedenen Stimuli aktiviert, die Einfluss auf den Zellzyklus und das Zellschicksal nehmen und damit auch eine Wirkung auf Tumorgenese und Metastasierung besitzen. Daher ist die Regulation von Signalwegen, die über das Zellschicksal entscheiden, wie z.B. der p53-p21-Signalweg, durch MAPK eine interessante Schnittstelle.

#### 1.4.1 ERK

Die ERK-Kaskade wird von Wachstumsfaktoren und Mitogenen induziert und hat vor allem Einfluss auf das Zellwachstum und Zelldifferenzierung. Die Aktivierung erfolgt über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die zu einer Ladung des G-Proteins Ras mit GTP führt, wodurch die MKKK a-Raf, b-Raf und c-Raf, oder auch MLTK (*MLK-like mitogen-activated protein triple kinase*) an die Membran rekrutiert und so angeschaltet werden können. Von diesen werden die MKs MEK1 und MEK2 (MAPK/ERK Kinase1 und 2) phosphoryliert, die ERK1 und ERK2 durch Phosphorylierung am Thr-Glu (Glutaminsäure)-Tyrosin-Motiv aktivieren (Dhillon et al., 2007). ERK1 und ERK2 üben Funktionen im Zellzyklus und in der Apoptose aus. Während ein geringes Signal von Raf, und damit von ERK, zur Zellzyklusprogression am G<sub>1</sub>-S-Phasenübergang beiträgt, verhindert auf der anderen Seite ein starkes ERK-Signal die DNA-Synthese, was auch mit einer Erhöhung der p53- und p21-Expression verbunden ist (Meloche & Pouyssegur, 2007). Da ERK in der Lage ist, die Funktion von pro-apoptotischen Proteinen (Caspase-8, -9, Bim, Bad) zu supprimieren und die Aktivität von anti-apoptotischen Molekülen (Bcl-x<sub>L</sub>, MCL-1) zu verstärken, ist ERK ein Inhibitor der Apoptose. Allerdings besitzt ERK nach Stressstimuli (z.B. DNA-Schädigung) durch die positive Regulation von p53, Erhöhung der Bax-Expression und Einfluss auf den Cytochrome c-Freisetzung aus den Mitochondrien auch einen pro-apoptotischen Effekt (Lu & Xu, 2006).

#### 1.4.2 JNK

JNKs, oder auch SAPKs (*stress activated protein kinases*), werden durch umweltbedingte Stimuli (Bestrahlung, oxidativer Stress, DNA-Schädigung) oder auch von Wachstumsfaktoren aktiviert und haben eine Funktion in der Apoptose und in der Entzündungsantwort. Es existieren 13 verschiedene MKKKs (z.B. MEKK1/4, MLK2/3, ASK1), die den JNK-Signalweg regulieren, was verdeutlicht, dass diese Signalkaskade durch viele unterschiedliche Stimuli initiiert werden kann (Johnson & Lapadat, 2002). JNK, von dem es 10 verschiedene Isoformen gibt, wird durch die MKKs MKK4 und MKK7 am Motiv Thr-Pro (Prolin)-Tyr phosphoryliert. Eins der bekanntesten und namensgebenden

Substrate von JNK ist c-Jun, welches ein Teil des AP1-Transkriptionsfaktorkomplexes ist (Morrison, 2012). Im Zusammenhang mit dem Überleben der Zelle und der Apoptose ist die Funktion von JNK abhängig vom zellulären Kontext. So kann JNK in unstimulierten Zellen p53 binden und damit destabilisieren (Fuchs et al., 1998a), wohin gegen die Aktivierung von JNK zur Phosphorylierung und damit Stabilisierung des p53-Proteins führt (Fuchs et al., 1998b). JNK beeinflusst auch die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien nach einem schädigenden Stimulus (Davis, 2000). In der Tumorentwicklung kann JNK sowohl tumorsuppressiv wirken, als auch zum Überleben des Tumors beitragen (Kennedy & Davis, 2003).

#### **1.4.3 p38**

Die MAPK p38, von der vier Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  existieren, wird ebenfalls durch umweltbedingten Stress, v.a. in physikalischer und chemischer Form, und durch Cytokine aktiviert. So hat p38 Einfluss auf verschiedene Prozesse wie Apoptose, Zelldifferenzierung, Regulation des Zellzyklus und Entzündungen. Die MKKKs MLK2 und MLK3, MEKK4 und ASKs aktivieren die MKKs MKK3 und MKK6, die p38 am Thr-Gly (Glycin)-Tyr-Motiv phosphorylieren (Zarubin & Han, 2005). Das p38-Signal kann einen tumorsuppressiven Effekt haben, da es z.B. durch Aktivierung von p53 eine Rolle in der Induktion der Apoptose spielt und den Zellzyklus negativ reguliert (Dhillon et al., 2007). So wird durch p38 die Aktivität von Cyclinen verringert bzw. von CDK-Inhibitoren erhöht, was die Zellproliferation verhindert. Außerdem kann p38 nach verschiedenen DNA-schädigenden Stimuli auch zum Überleben der Zelle beitragen (Thornton & Rincon, 2009). Darüber hinaus wird auch vermutet, dass p38 Zellinvasion und Metastasierung z.B. durch Remodellierung der extrazellulären Matrix von Tumoren fördert (Cuenda & Rousseau, 2007).

#### **1.4.4 Regulation von p21 durch MAPK**

Da es von großer Bedeutung ist, die p21-Expression strikt zu regulieren, wird dieser Prozess von verschiedenen Signalwegen kontrolliert. In mehreren Studien wurde bereits gezeigt, dass die Expression von p21 auf verschiedenen Ebenen durch MAPK p53-abhängig und unabhängig reguliert wird. Während der Chondrozyten-Differenzierung aktiviert der Raf-1-MEK1/2-ERK1/2-Signalweg den p21-Promotor über die Ets-Transkriptionsfaktor-Familie (Ciccarelli et al., 2005). ERK wird durch die Stimulierung mit Zink in HT29, einer kolorektalen Tumorzelllinie, phosphoryliert, was zu einer Erhöhung der p21 mRNA-Expression und zu einer Inhibition der Zellproliferation führt. Allerdings wird vermutet, dass noch weitere Faktoren außer ERK an dieser Regulation beteiligt sind (Park et al., 2002). In HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) wird die Aktivität von ERK durch die Inhibition von MEK durch Terbinafine, ein Antimykotikum, verringert, was

zu einer Steigerung der p53- und damit auch der p21-Expression führt (Ho et al., 2008). JNK spielt eine Rolle in der Stabilisierung des p21-Proteins in der Actin-Zytoskelett-Regulation. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von Rho und der Verlust der Zytoskelett-Integrität, z.B. die Zerstörung von F-Actin, mit einem Zellzyklusarrest assoziiert sind, was mit der Stabilisierung von p21 in Abhängigkeit von JNK einherging (Coleman et al., 2006). In gesunden und malignen Hepatozyten dagegen wird JNK zur Proliferation benötigt, da die p21-Expression in JNK  $-/-$  Zellen erhöht war, was auf eine wichtige Rolle für p21 in der JNK-abhängigen Leberkarzinogenese schließen lässt (Hui et al., 2008). In Abhängigkeit von p53 reguliert p38 $\delta$  die p21-Expression. Die Aktivierung von p38 $\delta$  durch Protein-Kinase C  $\delta$  in Keratinozyten erhöht die Transkription der p53 mRNA und damit in Folge auch die p21-Promotoraktivität, was zu einer Unterdrückung der Proliferation führt (Saha et al., 2014). Einen direkten Effekt auf die p21-Expression hat p38 in U2OS-Zellen nach der Inhibition von Aurora B. Dies führt zur Aktivierung von p38, die vermutlich durch Phosphorylierung der RNA-Polymerase II zur transkriptionellen Elongation von p21 benötigt wird (Kumari et al., 2013). Nach Behandlung mit  $\gamma$ -Bestrahlung ( $\gamma$ IR) erhöht p38 die Stabilität der p21 mRNA, was Einfluss auf die Ausprägung des G<sub>1</sub>-Arrests hat und einen translationalen Mechanismus darstellt (Lafarga et al., 2009). Auf post-translationaler Ebene stabilisiert p38 $\alpha$ , wie bereits beschrieben (Kapitel 1.2.1), das p21-Protein durch Phosphorylierung an Serin130 nach der Aktivierung durch TGF- $\beta$ 1 in HD3-Kolonkarzinom-Zellen. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass JNK p21 ebenfalls an dieser Stelle phosphoryliert und ebenfalls zur Stabilität des p21-Proteins beiträgt. Allerdings wurde die Aktivität der beiden MAPK nur getrennt voneinander untersucht, sodass kein kooperativer Effekt analysiert wurde (Kim et al., 2002).

#### **1.4.5 Regulation von RBPs durch MAPK**

RBPs werden durch MAPK und ihre Substrate reguliert, was dazu führen kann, dass sich die Fähigkeit der RBPs, mRNAs zu binden, ihre Stabilität zu verändern oder Translation zu steuern, modifiziert wird (Sugiura et al., 2011). ERK z.B. beeinflusst die Stabilisierung der *low-density lipoprotein receptor* (LDLR) mRNA. Nach PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*)-Gabe werden die RBPs ZFP36L1 und ZFP36L2 von RSK1 (p90 ribosomale S6 Kinase), einer Kinase, die ein ERK-Substrat darstellt, phosphoryliert. Dies hat die Dissoziation der RBPs von der LDLR mRNA zur Folge, wodurch die LDLR mRNA stabilisiert wird (Adachi et al., 2014). Einen direkten Effekt hat ERK auf das RBP hnRNPk, welches von ERK selbst phosphoryliert wird, was die Regulation von mRNAs durch hnRNPk beeinflusst (Habelhah et al., 2001b). Die Aktivierung von ERK nach Stimulation mit Prostaglandin A2 löst eine p21-Induktion in H1299-Zellen aus und führt zu einer ERK-unabhängigen erhöhten zytoplasmatischen Lokalisation von HuR. Dadurch erhöht sich



die Assoziation des RBPs mit der p21-3'UTR, wodurch die p21 mRNA stabilisiert und die p21-Proteinexpression erhöht wird (Yang et al., 2004).

Der JNK-Signalweg stabilisiert die Interleukin-2 (IL-2) mRNA in der T-Zell-Aktivierung. Die RBPs Nucleolin und YB-1, welche die IL-2 mRNA binden, werden für die Vermittlung dieses Effekts benötigt (Chen et al., 2000). Darüber hinaus assoziiert JNK mit verschiedenen RBPs während der neuronalen Differenzierung (Sury et al., 2015). Ein weiteres Zielprotein der Phosphorylierung durch JNK ist das RBP hnRNPK. Allerdings wird durch diese Phosphorylierung die transkriptionelle Aktivität des RBPs beeinflusst (Habelhah et al., 2001a), da hnRNPK auf Grund seiner KH-Domänen sowohl RNA, als auch einzelsträngige DNA binden kann und die Transkription verschiedener Gene durch direkte Bindung an den Promotor steuert (Gallardo et al., 2016). Allerdings ist es vorstellbar, dass eine Phosphorylierung auch die RNA-bindende Funktion beeinflusst.

Die MAPK p38 trägt zur Stabilisierung der uPA und uPAR mRNA in BT549-Zellen (Huang et al., 2000) und der Cox-2 mRNA nach Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation in Monozyten (Dean et al., 1999) bei. Interessanterweise führte die gleiche Behandlung auch zu einer p38-abhängigen Destabilisierung der TNF $\alpha$  mRNA (Rutault et al., 2001). Diese mRNAs enthalten AU-reiche Elemente (AREs) in ihrer 3'UTR, welche allgemein eine bedeutende Rolle in der Stabilisierung von mRNAs spielen (Chen & Shyu, 1995). Da p38 einen Effekt auf viele mRNAs besitzt, die ein ARE besitzen (Frevel et al., 2003), ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Regulation durch ARE-bindende RBPs vermittelt wird (Dean et al., 2004). Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass p38 mRNAs über RBPs reguliert, was auch in mehreren Studien gezeigt werden konnte. In seneszenten IMR90-Zellen wurde die Phosphorylierung von hnRNPA1 durch p38 für die zytoplasmatische Lokalisation benötigt, wo das RBP an der mRNA Prozessierung beteiligt ist (Shimada et al., 2009). Indirekt findet eine Regulation von RBM7 statt, welches vom p38-Substrat MK-2 (MAPKAPK-2) phosphoryliert wird und die RNA-Bindungskapazität von RBM7 verringert (Tiedje et al., 2015). MK-2 phosphoryliert außerdem viele weitere RBPs wie AUF1 oder HuR, was zu einer Veränderung der Stabilisierung oder Translation ihrer Zieltranskripte führt (Soni et al., 2019). HuR wird allerdings auch direkt von p38 phosphoryliert. Dieser Mechanismus führte nach der Stimulation mit  $\gamma$ IR, anders als bei ERK, zu einer p38-abhängigen Akkumulation von HuR im Zytoplasma und einer erhöhten Bindung an die p21 mRNA (Lafarga et al., 2009).

## **1.5 Zielsetzung**

Im Rahmen dieser Dissertation sollte der Einfluss eines neu-identifizierten p21 mRNA-bindenden Proteins, RBM47, auf die p21-Expression analysiert werden. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde im Labor für Molekulare Radioonkologie eine p21 mRNA-Immunopräzipitation (IP) durchgeführt, in der neben bekannten p21 mRNA-bindenden Proteinen auch RBPs identifiziert werden konnten, die bisher nicht im Zusammenhang mit p21 beschrieben wurden. Eines dieser RBPs war RBM47, welches mit einer 360-fachen Anreicherung ( $p\text{-value} < 10^{-6}$ ) spezifisch über die 3'UTR der p21 mRNA präzipitiert wurde. Durch die Bindung an die p21 mRNA lag die Vermutung nahe, dass RBM47 die Expression von p21 auf translationaler Ebene reguliert. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, diesen Mechanismus in zwei parallelen Ansätzen zu analysieren.

Da bekannt ist, dass MAPK nicht nur p21, sondern auch verschiedene RBPs regulieren und damit deren Expression, Funktion und Lokalisation modulieren, sollte erörtert werden, ob und welche Rolle RBM47 in der MAPK-regulierten p21-Expression spielt. Durch den Einsatz pharmakologischer MAPK-Inhibitoren (MAPK-I) sollte zunächst anhand von Western-Blot Analysen herausgefunden werden, welche MAPK die p21 Expression in HCT116 Zellen regulieren, um danach mittels exogener Expression verschiedener p21 Konstrukte (p21-ORF; p21-ORF-5'-3'UTR) zu analysieren, ob diese Regulation auf translationaler Ebene stattfindet. Falls ein translationaler Effekt, der potentiell vom RBP RBM47 vermittelt werden könnte, identifiziert werden kann, bestand die Absicht, durch zusätzliche exogene Expressions- und Reporteranalysen ein Einfluss von RBM47 in der MAPK-abhängigen p21-Expression zu untersuchen.

Parallel dazu war es das weitere Ziel dieser Arbeit, herauszuarbeiten, wie RBM47 die Expression von p21 moduliert. Hierfür sollte zunächst der Einfluss von RBM47 auf die p21-Protein- und mRNA-Expression in RBM47-depletierten Zellen untersucht werden, um im Anschluss unterschiedliche translationale Mechanismen, wie die Veränderung der mRNA-Stabilität oder Translationsrate zu analysieren. In Abhängigkeit der hierbei erzielten Ergebnisse sollte die weitere Vorgehensweise bestimmt werden. Nicht zuletzt sollte durch Seneszenz- und Zelltoduntersuchungen untersucht werden, inwiefern RBM47 Einfluss auf p21-vermittelte Zellschicksalsentscheidungen ausübt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, falls nicht anders vermerkt, von der Firma Merck (Darmstadt), Bio-Rad (München), AppliChem (Darmstadt), Thermo Fisher Scientific (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

**Tabelle 2: Ausgewählte Chemikalien**

Bezeichnung	Beschreibung	Bezugsquelle
<b>Actinomycin D</b>	Transkriptions-Inhibitor	Sigma-Aldrich (Merck)
<b>N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aminomethylcoumarin (Ac-DEVD-AMC)</b>	Fluorochrom-gekoppeltes Peptid	Biomol (Hamburg)
<b>5'Bromouridine 5'-triphosphate (sodium salt) (BrU)</b>	Bromiertes UTP zur Markierung von RNA	Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA)
<b>C<sub>12</sub>-FDG</b>	β-Galaktosidase-Substrat	Marker Gene Technologies (Eugene, OR, USA)
<b>X-Gal</b>	β-Galaktosidase-Substrat	AppliChem (Darmstadt)
<b>Cycloheximid (CHX)</b>	Translations-Inhibitor	Sigma-Aldrich (Merck)
<b>DharmaFECT 1</b>	Transfektionsreagenz	Dharmacon Horizon Discovery (Waterbeach, Cambridge, UK)
<b>DharmaFECT Duo</b>	Transfektionsreagenz	Dharmacon Horizon Discovery
<b>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung	Gibco (Thermo Fisher Scientific)
<b>Etoposide</b>	Chemotherapeutikum/Topoisomerase-II-Hemmer	Sigma-Aldrich
<b>HDGreen™</b>	Fluoreszenzfarbstoff zur Detektion von DNA in Agarosegelen	Intas
<b>MG-132</b>	Proteasom-Inhibitor	Enzo Life Sciences (Lörrach)
<b>Propidiumiodid (PI)</b>	DNA-Farbstoff	Sigma-Aldrich (Merck)
<b>Protein G Sepharose®, Fast Flow</b>	Protein G-beschichtete <i>Beads</i>	Sigma-Aldrich (Merck)
<b>5x siRNA Buffer</b>	Konzentrierte Lösung zur Resuspension von siRNA	Dharmacon Horizon Discovery
<b>TaqMan™ Universal PCR Master Mix, no AmpErase™ UNG</b>	qPCR-Master Mix	Applied Bioscience™ (Thermo Fisher Scientific)

## 2.1.2 Inhibitoren

Tabelle 3: MAPK-Inhibitoren

Bezeichnung	Inhibierte Kinase	Bezugsquelle
U0126	ERK/MEK1/2	Merck
SP600125	SAPK/JNK	Sigma-Aldrich (Merck)
SB203580	p38	Merck

## 2.1.3 Enzyme

Tabelle 4: Enzyme

Name	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Trypsin/EDTA	Lösen von adhärenen Zellen	Biochrom (Berlin)
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	DNA-Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
T4 DNA Ligase	DNA-Ligase	New England Biolabs
SacI	Restriktionsenzym	Thermo Fisher Scientific
XhoI	Restriktionsenzym	Thermo Fisher Scientific
MssI (PmeI)	Restriktionsenzym	Thermo Fisher Scientific

## 2.1.4 Medien und Zelllinien

Tabelle 5: Medien

Medium	Bezugsquelle
McCoy's 5A (Modified) Medium, GlutaMAX™ Supplement	Gibco™ (Thermo Fisher)
RPMI 1640 Medium	Gibco™ (Thermo Fisher)
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), high glucose	Gibco™ (Thermo Fisher)
Opti-MEM™ (Reduced Serum Medium)	Gibco™ (Thermo Fisher)

Tabelle 6: Zelllinien

Zelllinie	Herkunft/ Charakteristika	Medium/Supplemente	Bezugsquelle
HCT116 Wildtyp	Humane Kolonkarzinom-Zellen	McCoy's 5A 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) (Biochrom/Merck) 100 U/ml Penicillin+100 µg/ml Streptomycin (Millipore/Merck)	B. Vogelstein (Baltimore, MD, USA) (Bunz et al., 1998)
HCT116 p53-/-	p53-defizientes Derivat der HCT116	wie HCT116 Wildtyp	wie HCT116 Wildtyp
MCF-7	Humane Mammakarzinom-Zellen	RPMI 1640 10% (v/v) FCS (Biochrom/Merck) 100 U/ml Penicillin+100 µg/ml Streptomycin (Millipore/Merck)	ATCC (Jänicke et al., 1998)
UM-SCC-74A	Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereich	DMEM 10% (v/v) FCS (Biochrom/Merck) 100 U/ml Penicillin+100 µg/ml Streptomycin (Millipore/Merck)	K. Scheckenbach, Universitätsklinikum Düsseldorf/ University of Michigan (Brenner et al., 2010)

### 2.1.5 TaqMan® Gene Expression Assays

Tabelle 7: TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific)

Bezeichnung	Zielgen
Hs99999142_m1	<i>CDKN1A</i> (p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> )
Hs01034249_m1	<i>TP53</i> (p53)
Hs00177257_m1	<i>RPS6KA1</i> (Ribosomal protein S6 kinase alpha-a (RSK1))
Hs00540450_s1	<i>HDM2</i>
Hs05058894_s1	<i>HDMX</i>
Hs01001785_m1	<i>RBM47</i>
Hs00248075_m1	<i>BBC3</i> (PUMA)

### 2.1.6 siRNAs

Tabelle 8: siRNAs ON-TARGETplus siRNA

Zielgen	ID	Bezugsquelle
<b>RBM47</b>	54502	Dharmacon Horizon Discovery
<b>p53</b>	7517	Dharmacon Horizon Discovery

### 2.1.7 Antikörper

Tabelle 9: Primäre Antikörper

Antigen	Klon	Spezies, Isotyp	Firma	Artikelnummer	Eingesetzte Verdünnung
<b>β-Actin</b>	AC-74	Maus IgG2a	Sigma-Aldrich (Merck)	A5316	1:5000
<b>α-Tubulin</b>	DM1A	Maus IgG1	Sigma-Aldrich (Merck)	T6199	1:5000
<b>p53 (Ab-6)</b>	DO-1	Maus IgG2a	Merck	OP43	1:1000
<b>p21</b>	SX118	Maus IgG1 kappa	BD Bioscience (Heidelberg)	556430	1:500
<b>RBM47</b>	EPR9659	Kaninchen	Abcam (Cambridge, UK)	ab154176	1:1000
<b>FLAG</b>		Kaninchen	Sigma-Aldrich (Merck)	F7425	1:1000
<b>HuR</b>	3A2	Maus	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)	Sc-5261	1:1000
<b>hnRNP (AUF1)</b>		Kaninchen	Sigma-Aldrich (Merck)	HPA004911	1:1000
<b>HDM2</b>	IF2	Maus	Merck	OP46	1:500
<b>HDMX</b>	8C6	Maus	Merck	04-155	1:500
<b>SAPK/JNK</b>		Kaninchen	Cell Signaling Technology (Frankfurt a.M.)	9252	1:1000
<b>Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tr185)</b>	81E11	Kaninchen	Cell Signaling Technology	4668	1:1000
<b>P44/42 MAPK (ERK1/2)</b>		Kaninchen	Cell Signaling Technology	9102	1:1000
<b>Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)</b>	E10	Maus	Cell Signaling Technology	9106	1:1000
<b>p38 MAPK</b>		Kaninchen	Cell Signaling Technology	9212	1:1000
<b>Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)</b>	D3F9	Kaninchen	Cell Signaling Technology	4511	1:1000

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Reaktivität	Spezies	Bezugsquelle
IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG	IgG	Maus	Ziege	LI-COR (Bad Homburg vor der Höhe)
IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG	IgG	Kaninchen	Ziege	LI-COR
IRDye® 680RD Goat anti-Mouse IgG	IgG	Maus	Ziege	LI-COR
IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG	IgG	Kaninchen	Ziege	LI-COR

### 2.1.8 Oligonukleotide und Plasmid-DNA

Tabelle 11: Oligonukleotide (*Primer*)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Bezugsquelle
p53_Prom_356_fw	ATAGAGCTCGATCCAGCTGAGAGCAAACG	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)
p53_Prom_356_rev	TTACTCGAGCTAGACTTTTGAGAAGCTCAAA	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)

Tabelle 12: Plasmid-DNA

Bezeichnung	Bezugsquelle
pGL4.74[hRluc/TK] (Renilla)	Promega (Walldorf)
pcDNA-Luc	X. He (Wu et al., 2010)
pcDNA-Luc-p21-UTR	X. He (Wu, S. et al., 2010)
pGL4.10[luc2]	Promega
pGL2-p53-Prom-356bp	Wang, S. & El-Deiry, 2006
pGL4.10-p53-Prom-356bp	Radine et al., 2019
pGL4.10-p21-Prom-4,3kb	Radine et al., 2019
pCMV6	Origene (Rockville, Maryland, USA)
pCMV6-FLAG-RBM47	Origene
pcDNA3	F. Essmann (Graupner et al., 2009)
pcDNA3-FLAG-p53	F. Essmann (Graupner et al., 2009)
pcDNA4-FLAG-p21-ORF	Sohn et al., 2011
pcDNA4-FLAG-p21-5'3'UTR	Sohn et al., 2011
pcDNA4-FLAG-p21-5'UTR'	Sohn et al., 2011
pcDNA4-FLAG-p21-3'UTR'	Sohn et al., 2011

### 2.1.9 Größenstandard

Tabelle 13: Größenstandards

Name	Verwendungszweck	Bezugsquelle
PageRuler Prestained Protein Ladder	Protein-Größenstandard (10-180 kDa)	Thermo Fisher Scientific
SmartLadder	DNA-Größenstandard (0,2-10kb)	Eurogentec (Köln)
RiboRuler High Range RNA Ladder	RNA-Größenstandard (200-6000 Basen)	Thermo Fisher Scientific

## 2.1.10 Kits

Tabelle 14: Kits

Name	Verwendungszweck	Bezugsquelle
RNeasy Mini Kit	RNA-Isolation	Qiagen (Hilden)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	cDNA-Synthese	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Luciferase-Assay	Promega
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Plasmid-Isolierung	Qiagen
GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit	Plasmid-Isolierung	Sigma-Aldrich (Merck)
mMessage mMachin Kit	Erstellung von BrU-markierte RNA	Ambion (Thermo Fisher Scientific)
RiboCluster Profiler (Ribo Trap Kit)	Isolierung von RNP-Komplexen	MBL (Woburn, MA, USA)
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	LDH-Assay	Roche (Grenzach-Wyhlen)
QIAquick PCR Purification	Aufreinigungen von PCR-Produkten	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Aufreinigungen von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	Qiagen

## 2.1.11 Geräte

Tabelle 15: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Agarosegel-Elektrophoresekammer	Modell 40-1214	PeqLab Biotechnologie (Erlangen)
Bestrahlungsgerät (IR)	Gulmay Medical RS225	XStrahl (Camberley, UK)
CO <sub>2</sub> -Inkubationsschrank	Hera Cell 240	Thermo Fisher Scientific
Durchflusszytometer	BD LSR Fortessa	BD Biosciences
Einkanalpipetten	Research Plus	Eppendorf (Hamburg)
Heizblock	Rotilabo-Block-Heater H250	Roth (Karlsruhe)
Inkubationsschüttelschrank	Certomat BS-1	Sartorius Stedim Biotech (Göttingen)
Luminometer	Centro LB 960 Mikroplatten Luminometer	Berthold (Bad Wildbad)
Mikroplatten-Fluorometer	Infinite M200	Tecan (Langenfeld)
NanoDrop Spektralphotometer	NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific
Mikroskop	Axio Observer A1, AxioCam	Zeiss (Oberkochen)
pH-Meter	Orion 555A	Thermo Scientific Orion, Cambridgeshire (UK)
Real-Time PCR-Gerät	7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)
SDS-PAGE Elektrophoresekammer/ Blotapparatur	MiniProtean III	Bio-Rad
Sterilarbeitsbank	HeraSafe	Heraeus (ThermoFisher Scientific)
Thermocycler	TProfessional Standard Gradient Thermocycler	Biometra (Göttingen)
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Tisch-Zentrifuge	Centrifuge 5417 R Rotor F-45-30-11 (r=9,5 cm)	Eppendorf
Universalzentrifuge	HERAEUS Multifuge 3SR plus Rotor 75006445 (r=19,2 cm)	ThermoFisher Scientific
UV-Flächenstrahler	NU-72	Roth
Western Blot Detektion	Li-COR Odyssey Imager	Li-COR

## 2.1.12 Software

Tabelle 16: Software

Software	Verwendung	Version
<b>7300 System Sequence Detection Software (Applied Biosystems/ThermoFisher Scientific)</b>	qPCR	1.4
<b>BD FACSDiva Software</b>	FACS Messung	6.2
<b>Flowing Software (Cell Imaging Core, Turku Centre for Biotechnology, Finland)</b>	FACS Auswertung	2.5.1
<b>i-control (Tecan)</b>	Mikroplattenleser	1.5
<b>Li-COR Odyssey Application Software</b>	Western Blot-Scans/Densitometrien	3.0
<b>MikroWin2000 (Labsis Laborsysteme, Neunkirchen-Seelscheid)</b>	Auswertung Luciferase-Assay	4.0



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die verwendeten Zelllinien (Tabelle 6) wurden unter sterilen Bedingungen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in CO<sub>2</sub>-Inkubatoren kultiviert. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde Medium (Tabelle 5) verwendet, welches mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt wurde. Außerdem wurde unter biologischen Sicherheitswerkbänken gearbeitet und es wurden sterile Zellkulturflaschen und -schalen, Pipetten, Zentrifugenröhrchen genutzt. Um die Zellen zu passagieren, wurde das Medium von den Zellen aspiriert und die Zellen mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde der Zell-Monolayer mit Trypsin bedeckt und für 5-10 min im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Um die Aktivität des Trypsins abzustoppen, wurde Medium zu den Zellen geben. Es wurde mindestens das doppelte Volumen des verwendeten Trypsin-Volumens eingesetzt. Durch mehrmaliges Pipettieren wurden die am Boden verbliebenen Zellen zunächst abgelöst, und im Anschluss die Zellen weiter vereinzelt. Abhängig von der Dichte wurde ein Teil der Zellsuspension in ein neues, mit Medium befülltes Zellkulturgefäß überführt (Tabelle 17).

**Tabelle 17: Passierungsverhältnisse der verwendeten Zelllinien**

Zelllinie	Passagierungsverhältnis
HCT116 Wildtyp/p53-/-	1:6-1:10 alle 2-3 Tage
MCF-7	1:3-1:4 alle 2-3 Tage
UM-SCC-74A	1:4-1:6 alle 3-4 Tage

### 2.2.2 Stimulation von Zellen

#### 2.2.2.1 Anwendung von Radio- und Chemotherapie

Die Zellen wurden in der gewünschten Zellzahl ausgesät und je nach Versuchsanordnung vor der Bestrahlung behandelt (siRNA-Transfektion: 48-72 h vor der Bestrahlung; Plasmid-Transfektion: 24 h vor der Bestrahlung; Inhibitor-Behandlung: vor der Bestrahlung wie angegeben). Zur Radiotherapie wurden die Zellen Gulmay Medical RS225 mit ionisierender Röntgenstrahlung (IR) mit einer Dosis von 20 Gray (Gy) behandelt (175V, 15mA, 19 min 48 sec). Für die Chemotherapie wurde Etoposid in einer Konzentration von 50 µM in Medium eingesetzt, welches kurz vor der Verwendung verdünnt wurde. Die Zellen wurden sowohl vor, als auch nach der Behandlung mit IR bzw. Etoposid unter sterilen Bedingungen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in CO<sub>2</sub>-Inkubatoren kultiviert.

### **2.2.2.2 Stimulation mit MAPK-Inhibitoren**

Die Zellen wurden in der gewünschten Zellzahl ausgesät und je nach Versuchsanordnung vor der Stimulation behandelt (Plasmid-Transfektion: 8 h vor der Stimulation). Es wurden die spezifischen Inhibitoren U0126 (Inhibition von MEK1/2), SP600125 (Inhibition von JNK) und SB203580 (Inhibition von p38) in einer Konzentration von 20  $\mu$ M eingesetzt. 45 min nach der Inhibitor-Stimulation wurden die Zellen mit 20 Gy bestrahlt. Die Zellen wurden sowohl vor, als auch nach der Behandlung mit dem Inhibitor bzw. IR unter sterilen Bedingungen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in CO<sub>2</sub>-Inkubatoren kultiviert.

### **2.2.3 Transiente Transfektion von Humanzellen mit *small-interfering* RNAs (siRNAs)**

Durch die Transfektion mit *small-interfering* RNAs (siRNAs) kann gezielt die Expression bestimmter Gene reduziert werden. Dabei wird das zelleigene System der RNA-Interferenz (RNAi) genutzt. In der Zelle vorkommende kurze, doppelsträngige RNA-Moleküle (z.B. miRNAs) werden in den RISC (*RNAi-induced silencing complex*) eingelagert und in Einzelstränge getrennt. Einer der Stränge verbleibt im Komplex (während der andere abgebaut wird) und kann an komplementäre mRNA binden. Dies führt zum Abbau der mRNA oder zur Translationsinhibition, sodass die Proteinexpression eines bestimmten Gens reduziert wird. Artifizuell hergestellte siRNAs imitieren die natürlich vorkommenden kurzen, doppelsträngigen RNA-Moleküle, sodass durch ihre Verwendung die Expression eines gewählten Gens gezielt verringert werden kann (*Knockdown*) (Shan, 2010).

Zur Transfektion wurden ON-TARGETplus SMARTpool siRNAs (Tabelle 8) verwendet, welche aus einer Mischung von vier verschiedenen siRNAs gegen eine mRNA in einem Reagenz bestehen. Diese Kombination garantiert eine Verringerung der Genexpression auf dem mRNA-Level von mindestens 75%. Ein weiterer Vorteil ist die Reduktion von *Off-target*-Effekten, da diese sich bei den einzelnen siRNAs unterscheiden und mit abnehmender Konzentration der einzelnen siRNAs verringern. Im SMARTpool sind die einzelnen siRNAs geringer konzentriert, sodass es zu weniger *Off-target*-Effekten kommt, während die spezifische Genexpression weiter stark supprimiert ist. Als Transfektionsreagenz wurde DharmaFECT 1 (Tabelle 2) genutzt und die Transfektion nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Zellen der jeweiligen Zelllinie wurden in einer Dichte von  $4 \times 10^5$  pro Vertiefung einer 6-Well-Platte am Vortag der Transfektion ausgesät und im entsprechenden Medium (Tabelle 6) kultiviert. Am Tag der Transfektion wurden je siRNA 10  $\mu$ l der 20  $\mu$ M siRNA-Lösung (in 1x siRNA-Puffer) in 90  $\mu$ l 1x siRNA-Puffer verdünnt und 100  $\mu$ l serum-freies

Medium (Opti-MEM) zugegeben (Lösung 1). Je Ansatz wurden 4 µl DharmaFECT 1 mit 196 µl Opti-MEM vermischt (Lösung 2). Für mehrere Transfektionen wurde Lösung 2 entsprechend im Überschuss angesetzt. Beide Lösungen wurden vorsichtig durchmischt und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. 200 µl von Lösung 2 wurden zur Lösung 1 pipettiert, vorsichtig vermischt und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1,6 ml Penicillin/Streptomycin-freies Medium je Ansatz zugegeben und das Transfektionsmedium wurde nach Aspiration des Kulturmediums auf die am Vortag ausplattierten Zellen in die Vertiefung der 6-Well-Platte gegeben. Die finale Konzentration der siRNA lag so bei 100 nM. Die Zellen wurden 8-24 h nach der Transfektion abhängig von den Versuchsbedingungen aufgeteilt und nach weiteren 24-48 h stimuliert. Während des Versuchs wurden die Zellen weiterhin bei 37°C unter 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Wenn größere Mengen an transfizierten Zellen benötigt wurden, wurde das Protokoll entsprechend hoch skaliert.

#### **2.2.4 Transiente Transfektion von Humanzellen mit Plasmid-DNA**

Durch das Einbringen von Plasmid-DNA können die in den Konstrukten enthaltenen Gene in den transfizierten Zellen exprimiert werden. Die Plasmide enthalten neben dem zu exprimierenden Gen eine Expressionskassette, sodass eine Expression in der Zelle stattfinden kann. Je nach Hintergrund kann ein Promotor im Konstrukt verwendet werden, der ständig aktiv ist, was zu einer konstitutiven Expression (=Überexpression) des Gens führt (z.B. Humaner Cytomegalovirus (CMV)-Promotor). Allerdings kann auch ein Promotor (-fragment) eines Gens verwendet werden, um eine natürliche Expression in Abhängigkeit des verwendeten Promotors zu imitieren.

Zur Transfektion von Humanzellen mit Plasmid-DNA wurde das Transfektionsreagenz DharmaFECT Duo (Tabelle 2) verwendet. Pro Vertiefung einer 6-Well-Platte wurden in Abhängigkeit von der Funktion des im Plasmid kodierten Proteins verschiedene Mengen des Plasmids eingesetzt (in 6cm-Schalen wurde die doppelte Menge verwendet) (Tabelle 18).

**Tabelle 18: Funktion und eingesetzte Menge (pro Vertiefung einer 6-Well-Platte) der transfizierten Plasmide**

<b>Plasmid</b>	<b>Funktion</b>	<b>Menge</b>
<b>pGL4.74[hRluc/TK] (Renilla)</b>	Transfektionskontrolle im Luciferase-Assay	1,25-2,5 ng
<b>pcDNA-Luc / pcDNA-Luc-p21-UTR</b>	Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit der p21-3'UTR	100 ng
<b>pGL4.10 / p53-Prom-356bp / p21-Prom-4,3kb</b>	Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit des p53- bzw. p21-Promotors	250 ng
<b>pCMV6 / FLAG-RBM47</b>	Überexpression RBM47	250 ng-1 µg
<b>pcDNA4-FLAG-p21-ORF / pcDNA4-FLAG-p21-5'3'UTR'</b>	Überexpression p21 in Abhängigkeit der UTRs	1 µg

Am Vortag der Plasmid-Transfektion wurden die Zellen der jeweiligen Zelllinie, unabhängig davon ob untransfiziert oder nach einer bereits erfolgten siRNA-Transfektion, in einer Dichte von  $4 \times 10^5$  pro Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät und im entsprechenden Medium (Tabelle 6) kultiviert. Am Tag der Transfektion wurde die entsprechende Menge Plasmid (Tabelle 12) auf ein Volumen von 200  $\mu$ l im entsprechenden Medium verdünnt (Lösung 1). Wurden mehrere Plasmide gleichzeitig transfiziert, so wurden alle Plasmide in einer Lösung verdünnt. Pro Ansatz wurden 4  $\mu$ l DharmaFECT Duo mit 196  $\mu$ l Opti-MEM vermischt (Lösung 2). Für mehrere Transfektionen wurde Lösung 2 entsprechend nach Herstellerangaben im Überschuss angesetzt. Beide Lösungen wurden vorsichtig durchmischt und 5 min bei RT inkubiert. 200  $\mu$ l von Lösung 2 wurden zur Lösung 1 pipettiert, vorsichtig vermischt und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1,6 ml Penicillin/Streptomycin-freies Medium je Ansatz zugegeben und das Transfektionsmedium wurde nach Aspiration des Kulturmediums auf die am Vortag ausplattierten Zellen in die Vertiefung der 6-Well-Platte gegeben. Die Zellen wurden, wenn nötig, 8 h nach der Transfektion abhängig von der Versuchsanordnung aufgeteilt und nach weiteren 16 h stimuliert, oder direkt 8 h nach der Transfektion stimuliert. Während des Versuchs wurden die Zellen weiterhin bei 37°C unter 5%CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **2.2.5 Kolorimetrischer SA- $\beta$ -Gal-Nachweis**

#### ***Fixierungs-Lösung***

2% Formaldehyd (v/v)  
0,2% Glutaraldehyd (v/v)  
in PBS

#### ***Färbe-Lösung***

40 mM Zitronensäure/Natriumphosphat-Lösung  
5 mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 3H<sub>2</sub>O (Kalium-Hexacyanoferrat(II))  
5 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (Kalium-Hexacyanoferrat(I))  
150 mM Natriumchlorid  
2 mM Magnesiumchlorid  
1mg/ml X-Gal

Ein häufig genutzter Biomarker für den Nachweis seneszenten Zellen ist die Aktivität der Seneszenz-assoziierten Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal) (Dimri et al., 1995). Die  $\beta$ -Galaktosidase ist ein lysosomales Enzym, welches in seneszenten und nicht-seneszenten Zellen exprimiert wird und bei einem sauren pH von 4 optimal aktiv ist. Die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase kann kolorimetrisch durch die Hydrolyse von X-Gal zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol, welcher zu einem blauen, wasserunlöslichen Farbstoff (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo) oxidiert und die Zellen färbt, nachgewiesen werden (Debacq-Chainiaux et al., 2009). In der Seneszenz kommt es zu einer Vergrößerung des lysosomalen Inhalts, sodass auch die  $\beta$ -Galaktosidase vermehrt exprimiert wird und deren

verstärkte Aktivität nachgewiesen werden kann. Da auch nicht-seneszente Zellen eine aktive  $\beta$ -Galaktosidase besitzen, wird die Reaktion bei einem suboptimalen pH von 6 durchgeführt, da beim pH-Optimum von 4 sowohl seneszente als auch nicht-seneszente Zellen eine nicht unterscheidbare Färbung generieren. Bei pH 6 ist im Gegensatz zum pH 4 die spezifische Aktivität des Enzyms sehr gering, sodass seneszente Zellen im Vergleich zu nicht-seneszenten Zellen durch die erhöhte lysosomale  $\beta$ -Galaktosidase-Menge eine frühere Färbung aufweisen (Kurz et al., 2000).

Für den Nachweis wurden die Zellen zunächst in den Vertiefungen einer 6-Well-Platte ausgesät und einen Tag später mit IR stimuliert. Die Zellzahl wurde abhängig von der Versuchsanordnung gewählt, sodass bei der Färbung eine Konfluenz von 40-60% vorlag. Zum gewünschten Analysezeitpunkt nach der Stimulation wurde der Überstand von den Zellen aspiriert und die Zellen zweimal vorsichtig mit 1 ml PBS gewaschen. Pro Vertiefung der 6-Well-Platte wurden die Zellen in 750  $\mu$ l Fixierungs-Lösung bei RT für 5 min inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen erneut mit zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Über Nacht wurden die Zellen lichtgeschützt und luftdicht in 750  $\mu$ l Färbelösung mit pH 6 bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch erneutes Waschen mit PBS gestoppt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit PBS überschichtet und die Zellkulturplatten wurden bei 4°C bis zur Auswertung aufbewahrt. Innerhalb der nächsten Tage wurde der Zustand der Zellen mikroskopisch mit Fotos dokumentiert.

### **2.2.6 Durchflusszytometrische Quantifizierung der SA- $\beta$ -Gal-Aktivität**

Die durchflusszytometrische Quantifizierung der Aktivität der SA- $\beta$ -Gal basiert auf dem in Kapitel 2.2.5 beschriebenen Vorkommen der SA- $\beta$ -Gal in seneszenten Zellen. Im Unterschied zum kolorimetrischen Nachweis wird bei der durchflusszytometrischen Methode zunächst die Ansäuerung der Lysosomen durch die Inkubation mit einem Inhibitor der vakuolaren H<sup>+</sup>-ATPasen (z.B. Bafilomycin A1) verhindert und der pH der Lysosomen auf etwa 6 erhöht (Debacq-Chainiaux et al., 2009). Als Substrat für die SA- $\beta$ -Gal dient anschließend C<sub>12</sub>-FDG (5-Dodecanoylaminofluorescein Di- $\beta$ -D-Galactopyranoside), welches auf Grund der Kohlenstoffkette als Glykolipid in die äußere Lipidschicht der Zellmembran eingelagert, durch einen *Flip-flop*-Mechanismus in die innere Lipidschicht transferiert wird und so in Zelle gelangt. Dort kann C<sub>12</sub>-FDG in einen grün-fluoreszierenden Farbstoff (C<sub>12</sub>-Fluorescein) hydrolysiert werden, welcher auf Grund der Kohlenstoffkette in der Zellmembran verbleibt (Zhang et al., 1991). Die Zellen, die positiv für Fluorescein sind und deshalb eine Aktivität der SA- $\beta$ -Gal zeigen, können im Durchflusszytometer detektiert und quantifiziert werden (Debacq-Chainiaux et al., 2009).

Die Zellen der jeweiligen Zelllinie wurden in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  pro Vertiefung einer 12-Well-Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit siRNA



transfiziert und 24<sup>h</sup> nach der Transfektion je nach Versuchsanordnung im Verhältnis 1:3-1:6 in die Vertiefungen einer 12-Well-Platte aufgeteilt. Nach weiteren 24<sup>h</sup> wurden die Zellen mit IR stimuliert. 72 h nach der Stimulation wurden der Überstand der Proben in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Auf die Zellen wurde sofort 500 µl einer 100 nM Bafilomycin A1-Lösung in Zellkulturmedium gegeben und bei 37°C inkubiert. Es erfolgte eine Zentrifugation der Zellüberstände (500 x g, RT, 5 min). Das Pellet wurde ebenfalls in 500 µl einer 100 nM Bafilomycin A1-Lösung resuspendiert und zur entsprechenden Probe in die Vertiefung der Well-Platte zurückgegeben. Nach einer Stunde Inkubation unter Zellkulturbedingungen (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) wurde 16,5 µl einer 2 mM C<sub>12</sub>-FDG-Lösung (~33µM-Endkonzentration) pro Vertiefung zugesetzt und erneut für 2-3 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Für die durchflusszytometrische Analyse wurde der Überstand der Proben in FACS-Röhrchen auf Eis überführt. Die adhären Zellen wurden mit Trypsin (5 min, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>) abgelöst und ebenfalls in das entsprechende FACS-Röhrchen zum Überstand überführt. Nach einer Zentrifugation (500 x g 4°C, 5 min) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung am LRS Fortessa (Kanal FITC-A), um die Zahl C<sub>12</sub>-Fluorescein-positiver Zellen zu detektieren. Pro Bedingung wurden 10.000 Zellen (*events*) mit einer Rate von 200-400 *events*/Sekunde gemessen.

### **2.2.7 Messung des Zelltods durch Propidiumiodid-Aufnahme**

#### ***PI-Puffer***

2,5 µg/ml Propidiumiodid  
In PBS

Propidiumiodid (PI) ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, dessen Fluoreszenz sich durch die Bindung an Nukleinsäuren um das 20-30-fache erhöht (Unal Cevik & Dalkara, 2003). PI kann mit einer Wellenlänge zwischen 400 und 600 nm angeregt werden (Anregungsmaximum 535 nm) und emittiert Licht zwischen 600 und 700 nm. Da PI nicht Zellmembran-permeable ist, nehmen lebende Zellen den Farbstoff nicht auf. Tote Zellen besitzen unabhängig von der Form des Zelltods im Vergleich zu lebenden Zellen jedoch keine intakte Plasmamembran mehr, weshalb PI in tote Zellen gelangt und dort in die DNA interkaliert. Durch die Aufnahme von PI und Anfärbung der DNA können lebende (PI-negativ) und tote Zellen (PI-positiv) durchflusszytometrisch voneinander unterschieden und quantifiziert werden (Crowley et al., 2016).

Die Zellen der jeweiligen Zelllinie wurden in einer Dichte von 1,5x10<sup>5</sup> pro Vertiefung einer 12-Well-Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit siRNA transfiziert und 24<sup>h</sup> nach der Transfektion je nach Versuchsanordnung im Verhältnis 1:3-1:6 in die Vertiefungen einer 12-Well-Platte aufgeteilt. Nach weiteren 24<sup>h</sup> wurden die



Zellen wurden die Zellen mit IR stimuliert. 72 h nach der Stimulation wurde der Zellüberstand in ein FACS-Röhrchen überführt und die Zellen durch Trypsin (5 min, 37°C, 5°CO<sub>2</sub>) abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in die FACS-Röhrchen mit dem entsprechenden Überstand überführt. Um den zellulären Stress zu verringern, erfolgte zunächst eine Inkubation für 15 min auf Eis mit anschließender Zentrifugation (500 x g, 5 min., 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen (in Abhängigkeit der Pelletgröße) in 200-300 µl PI-Puffer resuspendiert und 10-15 min inkubiert. Danach erfolgte die durchflusszytometrische Messung am LRS Fortessa, um die Zahl PI-positiver Zellen zu detektieren. Dazu wurde die Vorwärtsstreuung (*forward scatter*, FSC) zur Bestimmung der Partikelgröße und die PI-Emission (Exzitationswellenlänge 488 nm, Emissionswellenlänge 617 nm) gemessen. Mittels beider Signale wurde durch die Negativ-Kontrolle die lebende Population (=PI-negativ) bestimmt, in der die Zellen größer sind (FSC höher) und eine geringe PI-Fluoreszenz besitzen. Tote Zellen (=PI-positiv) liegen außerhalb dieses Bereichs und weisen eine verringerte Größe (FSC geringer) und eine hohe PI-Fluoreszenz auf. Pro Bedingung wurden 10.000 Zellen (*events*) mit einer Rate von 200-400 *events*/Sekunde gemessen.

### **2.2.8 LDH-Zytotoxizitätstest**

Der LDH (Lactatdehydrogenase)-Zytotoxizitätstest ist eine weitere Methode zur Bestimmung des Zelltodes. Die LDH ist ein intrazelluläres Enzym der Milchsäuregärung, welches die reversible Reaktion von Pyruvat zu Lactat katalysiert und typischerweise konstant exprimiert wird. Durch den Zelltod wird die LDH freigesetzt, sodass deren Aktivität im Zellüberstand quantifiziert werden kann, die im Vergleich zu einer Negativ-Kontrolle einen Rückschluss auf den Zelltod zulässt. Im angewandten Assay katalysiert LDH die Umwandlung von Lactat zu Pyruvat unter Reduktion von NAD<sup>+</sup> zu NADH/H<sup>+</sup>. Bei Zugabe des Enzyms Diaphorase und 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (Tetrazolium, gelb) kann dieses durch Oxidation von NADH/H<sup>+</sup> zu 1,3,5-Triphenylformazan (Formazan, rot) reduziert werden. Die Extinktion von Formazan kann bei 490 nm gemessen werden und verhält sich proportional zur LDH-Aktivität.

In einer Vertiefung einer 12-Well wurden 1x10<sup>5</sup> Zellen je Bedingung ausgesät und mit siRNAs transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen in die Vertiefungen einer 96-well-Platte mit dem Ziel aufgeteilt, am Tag der Messung eine Konfluenz von 60-70% zu erhalten. Die Aufteilung erfolgte je nach Zelldichte in einem Verhältnis zwischen 1:40 bis 1:75. Für die unbestrahlten Kontrollzellen wurde eine höhere Verdünnung (1:200) gewählt, um eine ähnliche Konfluenz wie die der bestrahlten Zellen zu erreichen, da die unbestrahlten Zellen im Gegensatz zu den bestrahlten weiter proliferieren. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit einer Dosis von 20 Gy bestrahlt. Am Tag 5 nach der Bestrahlung wurden 100 µl des Zellüberstandes in eine neue 96-well-Platte überführt. Als

Kontrolle wurden 100 µl des Kulturmediums, das nicht mit Zellen inkubiert wurde, ebenfalls in eine Vertiefung der 96-well-Platte gefüllt, da FCS oft bereits eine basale LDH-Aktivität besitzt. Die Messung der LDH-Aktivität erfolgte mit dem *Cytotoxicity Detektion Kit (LDH)* von Roche (Tabelle 14). Pro Well wurden 100 µl Reaktionsgemisch bestehend aus *Catalyst* und *Dye solution* in einem Verhältnis von 1:46 hergestellt und zu den Zellüberständen pipettiert. Es wurde die Extinktion bei 490 nm alle 3 min für 30 min gemessen. Zur Auswertung wurde ein Zeitpunkt für alle Proben gewählt, an dem noch keine der Proben den Messbereich überschritten hatte.

### **2.2.9 Fluorometrischer Substrattest zur Messung der Caspase-3-Aktivität**

#### **Substratpuffer**

50 mM HEPES pH 7,3  
100 mM NaCl  
10% Sucrose  
0,1% CHAPS

Frisch zugesetzt wurden:

10 mM Dithiothreitol (DTT)  
50 mM Ac-DEVD-AMC

Mit dem fluorometrischen Substrattest kann die Aktivität von Caspase-3 nachgewiesen werden. Diese ist eine wichtige Effektor-Caspase, die für die Ausbildung des apoptotischen Phänotyps (DNA-Fragmentierung, *membrane blebbing*) benötigt wird (Jänicke et al., 1998). Daher ist die Aktivierung von Caspase-3 ein Maß für die Apoptose, da sich diese Prozesse nicht umkehren lassen. Um die Aktivität der Caspase-3 zu analysieren, werden Zellextrakte mit dem fluorogenen Substrat Ac-DEVD-AMC (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aminomethylcoumarin) inkubiert. Die Spaltung des Substrats durch Caspase-3 setzt das Fluorochrom Aminomethylcoumarin frei, welches spektrometrisch detektiert werden kann. Die Zunahme des Fluorochroms verhält sich proportional zur Aktivität von Caspase-3 im Lysat (Garcia-Calvo et al., 1999).

Zunächst wurden Zellextrakte hergestellt (Kapitel 2.2.10) und deren Proteinkonzentration bestimmt (Kapitel 2.2.11). In einer schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 50 µg Protein in einem Volumen von 50 µl Lysepuffer je Vertiefung und Probe vorgelegt und 150 µl Substratpuffer zugegeben. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 5 h in Abständen von 10 min mit einem Fluorometer (Tecan Infinite M200) bei einer Exzitationwellenlänge von 346 nm und einer Emissionswellenlänge von 442 nm. Die Auswertung der Messung mittels der Tecan i-control Software Version erfolgte abhängig von der gemessenen Aktivität in der Regel im 25. Zyklus (nach 4 h).

## 2.2.10 Präparation von Zellextrakten

### NP40-Lysepuffer

50 mM	1M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (pH 7,4, eingestellt mit HCl)
150 mM	Natriumchlorid
1% (v/v)	NP40
Frisch zugesetzt werden:	
1 mM	Natriumthiovanadat
1 mM	Natriumpyrophosphat
1 mM	PMSF
10 µg/ml	Pepstatin
10 µg/ml	Leupeptin
10 µg/ml	Aprotinin
1 mM	DTT

Zur Analyse der zytosolischen und Membran-gebundenen Proteine wurden die Zellen in einem Lysepuffer mit dem nicht-ionischen Detergens NP40 aufgeschlossen. Hierfür wurden die adhärennten Zellen mit einem Zellschaber abgelöst, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (5 min, 4°C, 5.000 x g). Nach Waschen des Zellpellets mit kaltem PBS wurden die Zellen sofort lysiert oder mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für die Zellyse wurde das Zellpellet in Abhängigkeit von seiner Größe in einer entsprechenden Menge NP40-Lysepuffer (50-200 µl) resuspendiert, für 30 min auf Eis inkubiert und regelmäßig gründlich durchmischt. Anschließend wurde das Zelllysate durch Zentrifugation (17.000 x g, 30 min, 4°C) von Zelltrümmern (z.B. Membranen) getrennt und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung des Zellextrakts erfolgte bei -80°C.

### 2.2.11 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Protein Assay von Bio-Rad nach Herstellerangaben verwendet. Dieser kolorimetrische Assay basiert auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau G-250 an basische und aromatische Reste der Proteine, wodurch das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm verschoben wird. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm kann photometrisch bestimmt werden und ist so ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung (Bradford, 1976).

Der Bio-Rad *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* wurde zunächst 1:5 in destilliertem Wasser verdünnt und 1 ml dieser Färbelösung wurde in einer lichtdurchlässigen Küvette vorgelegt. 2 µl der Proteinlösung (z.B. des Zellextrakts) wurden mit der Färbelösung in der Küvette vermischt. Die Absorption der Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Als Leerprobe wurden 2 µl NP40-Lysepuffer eingesetzt. Mit Hilfe einer Eichgerade, die aus BSA erstellt wurde, wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

## 2.2.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

### 5x SDS-Probenpuffer

0,0625 M	Tris
2% (w/v)	SDS ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
3% (v/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol
10% (v/v)	Glycerin
Spatelspitze	Bromphenolblau

### Sammelgel

3,75%	Acrylamid/Bisacrylamid (30%; 29:1)
0,125 M	Tris-HCl (pH 6,8)
0,1%	SDS
0,075%	APS
0,075%	TEMED

### Trenngel

10-12,5%	Acrylamid/Bisacrylamid (30%; 29:1)
0,375 M	Tris-HCl (pH 8,8)
0,1%	SDS
0,075%	APS
0,05%	TEMED

### SDS-PAGE Elektrodenpuffer (10x)

1,92 M	Glycine
0,25 M	Tris
1%	SDS

Durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine anhand ihres Molekulargewicht getrennt. Das Aufkochen der Proteine mit reduzierenden Thiolverbindungen (z.B.  $\beta$ -Mercaptoethanol) denaturiert die Proteine (Auflösung der Sekundär- und Tertiärstrukturen) und reduziert Disulfidbrücken. Die Zugabe von SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine, da sich die Moleküle an die hydrophoben Bereiche der Aminosäuresequenzen anlagern und so Protein-Detergens-Komplexe mit einer konstanten negativen Ladung entstehen (1,4 g SDS/1 g Protein). So können die Proteine im elektrischen Feld in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts getrennt werden, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts ist.

25  $\mu$ g Protein wurden mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 10 Minuten denaturiert. Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel mit einem 3,75%igen-Sammelgel und einem 10-12,5%igen Trenngel bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel in einer mit 1x SDS-PAGE-Elektrodenpuffer befüllten Elektrophorese-Kammer (MiniProtean III). Zur Feststellung des Molekulargewichts wurde zum Vergleich ein vorgefärbter Proteinstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Tabelle 13) neben den Proteinproben aufgetragen.

## **2.2.13 Western Blot**

### **10x Western Blot-Puffer**

1,92 M Glycine  
0,25 M Tris

### **PBS-T**

0,2% Tween-20  
In 1x PBS

### **Blockierungslösung**

4% Entfettetes Milchpulver  
In PBS-T

### **Primärantikörperlösung**

5% Bovines Serumalbumin (BSA)  
1:200-1:5000 Primärantikörper (Tabelle 9)  
0,1% Natriumazid  
In PBS-T

### **Sekundärantikörperlösung**

0,02% SDS  
1:50 000 IRDye® 800CW (Tabelle 10)  
Oder 1:30 000 IRDye® 680RD (Tabelle 10)  
In PBS-T

Durch das Western Blot-Verfahren werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (s. Kapitel 2.2.12) durch das Anlegen einer elektrischen Spannung auf eine Membran übertragen. Auf dieser können Proteine anhand spezifischer Antikörper detektiert werden. Zunächst wurde eine Immobilon-FL-PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran (Merck) durch Inkubation in Methanol für 1 min aktiviert und anschließend, wie die Polyacrylamid-Gele aus der SDS-PAGE, in 1x Western Blot-Puffer äquilibriert. Mittels des „Tank-Blot“-Verfahrens in der MiniProtean III-Kammer erfolgte die Übertragung der Proteine bei einer konstanten Stromstärke von 150 mA auf die PVDF-Membran. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran für 2 h in Blockierungslösung inkubiert, um unspezifische Proteinbindestellen abzudecken. Über Nacht erfolgte die Inkubation der PVDF-Membran mit der Primärantikörperlösung, die gegen ein bestimmtes Protein gerichtet ist, bei 4°C unter leichtem Schütteln. Am nächsten Tag wurde die PVDF-Membran einmal in PBS-T für 10 min gewaschen, danach für 15 min in Blockierungslösung inkubiert und dann erneut zweimal für 10 min in PBS-T gewaschen. Die Inkubation mit der fluoreszierenden Sekundärantikörperlösung erfolgte lichtgeschützt für 1 h bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde die PVDF-Membran erneut dreimal in PBS-T abgedeckt gewaschen und zum Abschluss zwischen zwei Filterpapieren getrocknet. Die Fluoreszenz der Sekundärantikörper wurde im Li-COR Odyssey Imager detektiert, um Proteinbanden sichtbar zu machen. Die PVDF-Membranen wurden bei 4°C aufbewahrt.

## **2.2.14 Untersuchung der Proteinstabilität**

### **2.2.14.1 Analyse des Proteinabbaus durch Inhibition der proteasomalen Degradation**

Um zu untersuchen, ob eine Stimulation den Abbau eines Proteins, und damit seine Stabilität, verändert, wurden die Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor MG-132 behandelt. Dieser verhindert die Degradation von Ubiquitin-konjugierten Proteinen, sodass es in der Zelle zu einer Anreicherung dieser Proteine kommt.

Dazu wurden die Zellen in einer 6 cm-Zellkulturschale mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  ausgesät. Nach einer Transfektion mit siRNA wurden die Zellen 24 h später der Anzahl der zu analysierenden Zeitpunkte entsprechend auf mehrere Vertiefungen einer 6-well-Platte aufgeteilt (Verhältnis 1:3-1:6). Entweder wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion mit 20 Gy IR bestrahlt und nach weiteren 24 h mit MG-132 (10  $\mu$ M) oder 72 h nach der Transfektion mit MG-132 (10  $\mu$ M) inkubiert. Zu den Analysezeitpunkten nach MG-132-Zugabe wurden die Zellen mittels eines Zellschabers geerntet und Zellextrakte gewonnen (Kapitel 2.2.10). SDS-PAGE (Kapitel 2.2.12) und Western Blot (Kapitel 2.2.13) zur Untersuchung der Proteinexpression erfolgten wie zuvor beschrieben.

### **2.2.14.2 Bestimmung der Halbwertszeit eines Proteins**

Zur Ermittlung der Stabilität eines Proteins wurden Zellen mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) behandelt. Durch den Stopp der Translation kann der Abbau eines Proteins über einen bestimmten Zeitraum verfolgt werden. Basierend auf der Abnahme des Proteins kann dessen Halbwertszeit bestimmt werden.

Dazu wurden die Zellen in einer 6 cm-Zellkulturschale mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  ausgesät. Nach Transfektion mit siRNA wurden die Zellen 24 h später, der Anzahl der zu analysierenden Zeitpunkte entsprechend, auf mehrere Vertiefungen einer 6-well-Platte aufgeteilt (Verhältnis 1:5-1:8) und 48 h nach der Transfektion mit 20 Gy IR bestrahlt. Zwei Stunden nach der Bestrahlung erfolgte die Zugabe von 10  $\mu$ g/ml CHX. Zu den Analysezeitpunkten nach CHX-Gabe wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in PBS mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Vertiefung gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation (5.000 x g, 5 min, 4°C) wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren und bei -80°C gelagert. Die Herstellung von Zellextrakten (Kapitel 2.2.10), sowie die Durchführung der SDS-PAGE (Kapitel 2.2.12) und des Western Blots (Kapitel 2.2.13) erfolgten wie zuvor beschrieben. Zur Bestimmung der Protein-Stabilität wurde die vorhandene Proteinmenge auf die Menge einer bestrahlten, aber mit CHX-unbehandelten Probe normalisiert. Die normalisierte Proteinmenge (in Prozent) wurde gegen die Analysezeitpunkte nach der CHX-Stimulation aufgetragen. Anhand der Datenpunkte



wurde eine lineare Regression durchgeführt und die so bestimmte Geradengleichung zur Berechnung der Halbwertszeit herangezogen.

### **2.2.15 Isolierung von RNA**

#### **DEPC-H<sub>2</sub>O**

0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC)  
in H<sub>2</sub>O  
gerührt über Nacht unter dem Abzug  
autoklaviert

Die Isolierung der gesamten RNA von humanen Zellen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Es wurde DEPC-H<sub>2</sub>O verwendet, da durch die Inkubation mit DEPC im Wasser vorhandene Ribonukleasen inaktiviert werden. Die adhären Zellen wurden mit einem Zellschaber geerntet und zentrifugiert (5 min, 4°C, 5.000 x g). Nach Waschen des Zellpellets mit kaltem PBS wurde dieses in 350 µl RLT-Puffer resuspendiert und für 30-60 sec unter Vibration vermischt. Die lysierten Zellen wurden entweder bei -80°C gelagert oder sofort zur RNA-Isolierung verwendet. Zum Zelllysat in RLT-Buffer wurden 350 µl 70% Ethanol (in DEPC-H<sub>2</sub>O) gegeben und invertiert, bis eine homogene Lösung entstand. Die Probe wurde auf eine *RNeasy Spin Column* gegeben, zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Diese und alle weiteren Zentrifugationen erfolgten bei 8.000 x g (RT, 30 sec). Nacheinander wurden 700 µl *Buffer RW1* und zweimal 500 µl *Buffer RPE* auf die *RNeasy Spin Column* gegeben, jeweils zentrifugiert und der Durchfluss verworfen, bevor der nächste Puffer verwendet wurde. Anschließend wurde die *RNeasy Spin Column* in ein neues 2 ml-Sammelgefäß gestellt und für 1 min zentrifugiert. Nachdem die *RNeasy Spin Column* in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß gestellt wurde, wurden 50 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O auf die Membran der *RNeasy Spin Column* pipettiert und für 1 min inkubiert. Die abschließende Zentrifugation zur Elution der RNA erfolgte für 1 min und die Konzentration und Reinheit der RNA wurde am Nanodrop gemessen. Die Konzentration der RNA, die aus Zellen aus einer Vertiefung einer 6-Well-Platte isoliert wurde, sollte größer als 100 ng/µl sein und lag in der Regel zwischen 200-700ng/µl. RNA besitzt ein Absorptionsmaximum bei 260 nm (A<sub>260</sub>), weshalb zur Beurteilung der Reinheit eine A<sub>260</sub>/280-Ratio zur Identifikation von Proteinverunreinigungen und eine A<sub>260</sub>/230-Ratio zur Bestimmung von Phenolresten gemessen wurde. Die Ratios sollten zwischen 1,9-2,1 bzw. 2,0-2,2 liegen.

### **2.2.16 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkription**

Bei der cDNA-Synthese werden aus RNAs mit Hilfe einer Reversen Transkriptase, welche eine RNA-abhängige DNA-Polymerase-Funktion besitzt, einzelsträngige komplementäre DNA-Stränge transkribiert. Zum Start der Transkription enthält das Reaktionsgemisch

*Random Primer*, wobei es sich um zufällig generierte Oligonukleotide handelt, die an verschiedenen Stellen innerhalb der RNA binden. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*.

Für die Reaktion wurden 1 µg RNA eingesetzt, welche in 10 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O verdünnt wurden. Pro Reaktion wurde ein 2x Mastermix bestehend aus folgenden Komponenten angesetzt:

- 0,8 µl dNTPs
- 2,0 µl 10x Reverse Transkription Buffer
- 2,0 µl *Random Primer*
- 3,2 µl Nuklease-freies H<sub>2</sub>O
- 1 µl RNase Inhibitor

Je 10 µl dieses Mastermixes wurden zu den 10 µl RNA-Verdünnung gegeben und vermischt. Die Reaktion erfolgte unter folgendem Programm im TProfessional Thermocycler:

Hybridisierung	Elongation	Inaktivierung
25°C	37°C	85°C
10 min	120 min	5 min

Die cDNA wurde kurzzeitig bei 4°C, langfristig bei -20°C gelagert.

### 2.2.17 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative PCR (qPCR) ermöglicht es, die Amplifikation eines spezifischen DNA-Moleküls in Echtzeit (*real time*) während der PCR zu verfolgen. Hierfür wurden die TaqMan™ Genexpressionsassays und der TaqMan™ Universal PCR Master Mix (ThermoFisher) verwendet. Diese bestehen aus *Primer* und Sonden, die für die zu bestimmende DNA-Sequenz spezifisch sind. Die Sonde enthält ein Fluorophor, welches durch einen Quencherfarbstoff gebunden ist. Während der PCR lagern sich Sonde und *Primer* jeweils an verschiedene Stellen des DNA-Strangs an. Die Synthese der DNA erfolgt mit einer DNA-Polymerase vom *Primer* aus. Trifft die Polymerase bei der Extension des *Primers* auf die am gleichen Strang gebundene Sonde, wird diese durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase abgebaut. So wird das Fluorophor von der Sonde und damit dem Quencher freigesetzt und das Reportersignal verstärkt.

Die qPCR erfolgte nach Herstellerangaben. Pro Reaktion wurde folgender Mastermix angesetzt und 25 ng cDNA (Kapitel 2.2.16) eingesetzt:

- 10 µl TaqMan™ Universal PCR Master Mix (2x)
- 1 µl TaqMan™ Genexpressionsassay (20x)
- 8,5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O

Die Messung erfolgte in Triplets im 7300 Real Time PCR System. Ein Zyklus bestand aus folgenden Schritten:

Initiale Inkubation	50°C	2 min	
Polymerase Inaktivierung	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	15 sec	40
Annealing/Extension	60°C	60 sec	Zyklen

Eine Sonde für das *Housekeeping*-Gen GAPDH, dessen Expression durch eine Bestrahlung nicht verändert wird, diente als interne Kontrolle.

### **2.2.18 Bestimmung der mRNA-Stabilität**

Um die Stabilität einer mRNA zu ermitteln, wurden Zellen mit dem Transkriptioninhibitor Actinomycin D (ActD) behandelt. Durch den Stopp der Transkription kann der Abbau einer mRNA über eine bestimmte Zeit verfolgt werden, in der die mRNA-Menge zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen wird, woraus eine Abbaurate und die Halbwertszeit bestimmt werden kann.

Die Zellen wurden in einer 6-Well-Platte mit einer Zellzahl von  $4 \times 10^5$  je Vertiefung ausgesät. Nach einer Transfektion mit siRNA wurden die Zellen der Anzahl der zu analysierenden Zeitpunkte entsprechend auf mehrere Vertiefungen einer 6-well-Platte aufgeteilt (Verhältnis 1:51:7) und 48 h nach der Transfektion mit 20 Gy bestrahlt, um den DDR-Signalweg und dessen regulierenden Faktoren zu aktivieren und die Expression von p53 und p21 zu induzieren. Da die p53 mRNA-Expression nach IR nicht stark zunimmt, wurden die Zellen zur Bestimmung der p53 mRNA-Stabilität bereits nach zwei Stunden mit 1  $\mu\text{g/ml}$  ActD behandelt. Im Fall der p21 mRNA-Stabilität wurden die Zellen erst drei Stunden nach IR mit ActD inkubiert, um eine höhere p21 mRNA-Expression nach einer DNA-Schädigung zu erzielen. Die Untersuchungszeitpunkte zur Bestimmung der mRNA-Mengen wurden abhängig von der aus der Literatur zu erwartenden Halbwertszeiten gewählt und nach ersten Tests angepasst. Ziel war eine Verringerung auf 50-60% der zu Beginn vorhandenen mRNA, jedoch konnte auf Grund der Zelltoxizität von ActD nicht länger als 16 h gemessen werden.

Zu den zu untersuchenden Zeitpunkten wurden die Zellen mit PBS gewaschen, und mit 350  $\mu\text{l}$  RLT-Buffer aus dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) versetzt. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen in RLT-Buffer vom Boden der Kulturschale gelöst, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 30-60 sec durch Vibration vermischt. Das weitere Vorgehen zur RNA-Isolierung (Kapitel 2.2.15), cDNA-Synthese (Kapitel 2.2.16) und qPCR (Kapitel 2.2.17) erfolgte wie zuvor beschrieben. Zur Bestimmung der mRNA-Stabilität wurde die Menge mRNA (in Prozent) gegen die Zeitpunkte der RNA-Isolierung aufgetragen. Als Referenz für die maximal vorhandene Menge an mRNA diente eine bestrahlte, aber mit ActD-unbehandelte Probe. Mit den Datenpunkten wurde eine lineare Regression durchgeführt. Die so bestimmte Abbaurate wurde zur Berechnung der Halbwertszeit herangezogen.

## **2.2.19 Luciferase-Assay**

Durch seine vielfältigen Einsatzmöglichkeiten ist es mit dem Luciferase-Assay möglich, die Expression eines Gens zu analysieren. Die Luciferase ist ein oxidatives Enzym, welches durch Umsatz eines Substrats Biolumineszenz erzeugt. Diese kann, wenn ihr Gen in einem Plasmid enthalten ist, mittels transienter Transfektion in die Zelle eingebracht werden. Dies führt zur Expression der Luciferase in den transfizierten Zellen. Nach einer Zelllyse kann die Aktivität der freigesetzten Luciferase bestimmt werden, die sich direkt proportional zur Expression des Luciferase-Gens verhält. Abhängig vom verwendeten Plasmid ist es möglich, den Einfluss verschiedener Elemente des zu untersuchenden Gens, wie z.B. eines Promotorfragments oder der 3'UTR, auf die Expression der Luciferase und damit im Rückschluss auf das zu untersuchende Gen zu analysieren. Wenn der Promotor (-fragment) eines Gens vor das Luciferase-Gen in das Plasmid eingebracht wird, kann die Aktivität dieses Promotors unter verschiedenen Bedingungen anhand der dadurch entstehenden Biolumineszenz gemessen werden. Steht die Luciferase dagegen unter dem Einfluss eines konstitutiv aktiven Promotors, kann durch Einbringen der DNA-Sequenz der 3'UTR eines Gens hinter das Luciferase-Gen untersucht werden, welchen Einfluss die 3'UTR unter verschiedenen Bedingungen auf die Lumineszenz hat.

Für die Messung der Luciferase-Aktivität wurde das *Dual-Reporter-Assay-System* (Promega) genutzt. In diesem kommen zwei einzelne Reportersysteme gleichzeitig zum Einsatz. Zum einen wurde die *Firefly-Luciferase* (aus *Photinus pyralis*) für die oben beschriebenen spezifischen experimentellen Bedingungen genutzt. Zum anderen diente die *Renilla-Luciferase* (aus *Renilla reniformis*) als interne Kontrolle der Transfektionseffizienz (pGL4.74[hRLuc/TK]). Beide Luciferasen können gemeinsam genutzt werden, da sie unterschiedliche Substrate unter verschiedenen Reaktionsbedingungen umsetzen. Nach der Lyse der Zellen, um die Enzyme freizusetzen, wurde das Substrat für die *Firefly-Luciferase* zum Zellextrakt (*Luciferase Assay Reagent II*, LAR II) gegeben und die Biolumineszenz gemessen. Durch die Zugabe durch das im Kit enthaltenen *Stop&Glo® Reagent* wurde die Biolumineszenz der *Firefly-Luciferase* abgelöscht und gleichzeitig das Substrat für die *Renilla-Luciferase* zugegeben, sodass deren Aktivität gemessen werden kann. Zur Untersuchung der Promotor-Aktivität wurde das pGL4.10-System eingesetzt, zur Untersuchung der 3'UTR der p21 mRNA diente der pcDNA-Luc (Tabelle 12). Als interne Kontrolle wurde in beiden Analysearten der Vektor pGL4.74[hRLuc/TK] mit dem Gen für die *Renilla-Luciferase* verwendet.

Für die Durchführung des Luciferase-Assays wurden die unbehandelten oder siRNA-transfizierten Zellen einer 12-Well-Platte mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  je Vertiefung ausgesät, mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert (Kapitel 2.2.4) und nach 8 h mit

IR stimuliert. 24 h nach der Transfektion (ohne Stimulation) bzw. nach der Stimulation wurde das Medium von den Zellen aspiriert und die Zellen mit PBS gewaschen. Für die Lyse wurden die Zellen mit 250 µl 1x *Passive Lysis Buffer* (PLB) versetzt und 15 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Die Extrakte wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (17.000 x g, 4°C, 1 min), um Zelltrümmer (wie z.B. Membranen) zu entfernen. Die Überstände wurden anschließend direkt für die Messung der Biolumineszenz verwendet oder mit flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80°C gelagert. Die Messung der Lumineszenz erfolgte im Berthold Centro LB 960 Mikroplatten Luminometer. Pro Probe wurden 100 µl LAR II und *Stop&Glo® Reagent* mit 1,1-fachen Überschuss angesetzt und an den Dispensern am Gerät bereitgestellt. 20 µl jeder Probe wurden in die Vertiefungen einer weißen 96-Well-Platte pipettiert und die Messung vorgenommen. Dabei wurden 100 µl LAR II pro Well injiziert und nach zwei Sekunden für fünf Sekunden die Firefly-Luciferase-Aktivität gemessen. Im Anschluss wurden 100 µl *Stop&Glo® Reagent* pro Well injiziert und ebenfalls nach zwei Sekunden wurde für fünf Sekunden die Renilla-Luciferase-Aktivität gemessen.

### **2.2.20 Erstellung des pGL4.10-p53-Prom-356bp-Plasmids**

Die Sequenz des 356bp-Fragments des p53-Promotors (Wang & El-Deiry, 2006) wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (Kapitel 2.2.20.1) durch Nutzung des pGL2-p53-Prom-356bp-Plasmids (Tabelle 12) als Vorlage und der Oligonukleotide p53\_Prom\_356\_fw und p53\_Prom\_356\_rev (Tabelle 11) amplifiziert. Mithilfe der Restriktionsenzyme SacI und XhoI wurde die Sequenz in den pGL4.10[*luc2*]-Vektor kloniert.

#### **2.2.20.1 Polymerase-Kettenreaktion**

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) können DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Durch den Einsatz sequenzspezifischer Oligonukleotide (Tabelle 11) können genau definierte Abschnitte der DNA durch eine thermostabile Polymerase synthetisiert werden. Es wurde die *Phusion® High-Fidelity* DNA-Polymerase eingesetzt, welche auf Grund ihrer 3'-5'-Exonuklease-Aktivität eine *Proof-Reading-Funktion* besitzt, was die Fehlerrate bezüglich des Einbaus falscher Nukleotide während der Amplifikation im Vergleich zu anderen Polymerasen verringert.

Reaktionsansatz und Zyklus erfolgten nach Herstellerangaben:

Menge	Komponente	Finale Konzentration
10 µl	5x Phusion HF Buffer	1x
1 µl	10 mM dNTPs	200 µM
2,5 µl	10 µM <i>Forward-Primer</i>	0,5 µM
2,5 µl	10 µM <i>Reverse Primer</i>	0,5 µM
1 pg-10 ng	Plasmid-DNA	
0,5 µl	Phusion DNA-Polymerase	1 <i>unit</i>
Ad 50 µl	H <sub>2</sub> O	



<b>Initiale Denaturierung</b>	<b>96°C</b>	<b>30 sec</b>	
Denaturierung	98°C	10 sec	
Annealing	45-72°C Abhängig vom Oligonukleotid	30 sec	25-35 Zyklen
Extension	72°C	15-30 sec per kb	
<b>Final Extension</b>	<b>72°C</b>	<b>10 min</b>	

Es wurden 25-35 Zyklen durchgeführt.

Für die weitere Verwendung nach der PCR wurde die amplifizierte DNA gereinigt (Kapitel 2.2.20.2) und in einem Agarosegel (Kapitel 2.2.20.3) auf die richtige Größe überprüft.

### **2.2.20.2 Aufreinigung von DNA aus einer Amplifizierung per PCR**

Nach der PCR wurde die DNA mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification* Kits gereinigt. In Anwesenheit einer hohen Salzkonzentration können die DNA-Fragmente, die größer als 100 bp sind, an die spezielle Silica-Membran in der im Kit enthaltenen Säulen adsorbieren. So können unerwünschte Reste der PCR-Reaktion (z.B. *Primer*, Nukleotide) von der DNA getrennt werden, da diese nicht an die Membran binden. Die Elution erfolgt unter einer geringen Salzkonzentration (z.B. in Wasser).

Zunächst wurden 5 Volumen des Puffer PB mit 1 Volumen PCR-Reaktion vermischt und in die Säule überführt. Nach einer Zentrifugation wurde der Durchfluss verworfen und die Membran wurde mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Die Säule wurde in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert und die Membran für 1 min mit 30 µl H<sub>2</sub>O inkubiert. Durch Zentrifugation wurde die DNA eluiert. Alle Zentrifugationen erfolgten bei 17.000 x g für 30-60 sec bei RT.

### **2.2.20.3 Agarosegel-Elektrophorese**

#### **TAE-Puffer**

40 mM Tris-Acetat (pH 8.0)  
1 mM EDTA

Die Agarosegel-Elektrophorese ist eine Methode, um DNA elektrophoretisch nach ihrer Größe aufzutrennen. Die Agarose bildet eine Gelmatrix, die als molekulares Sieb funktioniert. DNA besitzt ein negativ-geladenes Phosphat-Rückgrat, weshalb diese in einer Gelmatrix beim Anlegen eines elektrischen Feldes zur Anode wandert. Kleine Moleküle wandern auf Grund des kleineren effektiven Volumens schneller, größere Moleküle langsamer durch die Poren des Gels, sodass die Moleküle abhängig von ihrer Größe in der gleichen Zeit unterschiedlich weit im Gel bewegt wurden. Abhängig von der Konzentration der Agarose bildet das Gel eine spezifische Porengröße aus, in der sich verschieden große DNA-Moleküle optimal auftrennen lassen.

Je nach Größe der zu trennenden Moleküle wurden 0,8-1,5%-Agarosegele in TAE-Puffer verwendet. Um die DNA unter UV-Licht (UV-Flächenstrahler NU-72) sichtbar zu

machen, wurden die Gele mit 0,01% HDGreen™ versetzt. Als Größenstandard wurde die *SmartLadder* (200 bp bis 10 kb, Tabelle 13) aufgetragen. Die zu trennenden DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 10x *FastDigest Green Buffer* (Thermo Fisher Scientific) versetzt, falls sie diesen nicht schon durch eine vorgehende Restriktion enthielten. Die Trennung der DNA erfolgte unter Anlegung einer von der Gelgröße-abhängigen konstanten Spannung.

#### **2.2.20.4 Gelextraktion**

Nach einer Agarosegel-Elektrophorese wurden die Banden der gewünschten Größe aus dem Gel auf den UV-Flächenstrahler ausgeschnitten und gereinigt. Die Reinigung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem *QIAquick gel extraction* Kit, welches auf dem gleichen Prinzip wie das *QIAquick PCR Purification* Kit (s. Kapitel 2.2.20.2) basiert.

Zum gewogenen Gelstück wurde *Buffer QG* im Verhältnis von 1:3 (Gewicht zu Volumen) zugegeben und bei 50°C inkubiert, bis sich das Gel gelöst hatte. Anschließend wurde im Verhältnis 1:1 Isopropanol (v/v) zugegeben und die Probe auf die Säule überführt. Nach einer Zentrifugation (17.000 x g, 1 min, RT) wurde der Durchfluss verworfen und die Membran mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Die Säule wurde erneut zentrifugiert (17.000 x g, 1 min, RT) und in neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Mit 30 µl H<sub>2</sub>O wurde die Plasmid-DNA durch Zentrifugation (17.000 x g, 1 min, RT) eluiert.

#### **2.2.20.5 Restriktion**

Für die Restriktion von DNA-Fragmenten, um diese im weiteren Verlauf für eine Ligation zu nutzen, wurden die *FastDigest*-Enzyme (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Eine Reaktion hatte folgenden typischen Ansatz:

<b>Menge</b>	<b>Komponente</b>
2 µl	10x <i>FastDigest Green</i> Puffer
1 µl	Restriktionsenzym I
1 µl	Restriktionsenzym II (optional, falls benötigt)
2-5 µg	DNA
Ad 20 µl	H <sub>2</sub> O

Die Reaktion wurde für 1-2 h bei 37°C inkubiert.

#### **2.2.20.6 Ligation**

Bei der Ligation wird ein DNA-Fragment (*Insert*) mit Hilfe einer Ligase in ein Plasmid, welches zuvor wie das DNA-Fragment einer Restriktion mit den gleichen Restriktionsenzymen unterzogen wurde, eingebracht. Es wurde die T4-DNA-Ligase von *New England Biolabs* nach Herstellerangaben verwendet. Eine Reaktion hatte folgende Zusammensetzung:

<b>Menge</b>	<b>Komponente</b>
2 µl	10x T4-DNA-Ligase Puffer
50 ng	Plasmid-DNA
Molare Ratio 1:3 Plasmid-DNA zu <i>Insert</i>	<i>Insert</i> DNA
1 µl	T4-DNA-Ligase
Ad 20 µl	H <sub>2</sub> O

Die Reaktion wurde über Nacht bei 16°C oder für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Ligase bei 65°C für 10 min inaktiviert. Die Ligationsreaktion wurde bei 4°C gelagert und anschließend für die Transformation in hitzekompetenten Bakterien verwendet.

### **2.2.20.7 Transformation hitzekompetenter Bakterien**

#### **LB-Medium**

25 g Luria Broth Base (Miller's LB Broth Base)  
ad 1 l H<sub>2</sub>O

Die Transformation dient dazu, DNA (in Form eines Plasmids) mit Hilfe eines Hitzeschocks in Bakterien einzubringen. Dafür wurden 50 µl hitzekompetenter Bakterien (*E.coli*, DH5α) auf Eis aufgetaut und mit 5 µl Plasmid-DNA (z.B. aus der Ligation) vermischt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die Zellen für 45 sec einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und anschließend für 2 min auf Eis gestellt. Zu der Zellsuspension wurden 500 µl LB-Medium (Antibiotikum-frei) gegeben und die Reaktion bei 37°C für 1 h unter Schütteln inkubiert. 50 µl bis 200 µl der Zellsuspension wurden auf einer LB-Agar-Platte (mit entsprechendem Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die LB-Platte auf entstandene Kolonien überprüft.

### **2.2.21 Mini-DNA-Präparation aus *E.coli***

#### **LB-Medium**

25 g Luria Broth Base (Miller's LB Broth Base)  
ad 1 l H<sub>2</sub>O

Um zu überprüfen, ob eine nach der Transformation entstandene *E.coli*-Kolonie das gewünschte Plasmid enthält, wurde eine Mini-DNA-Präparation durchgeführt. Nach Inokulation einer 5 ml-Kultur (Mini-Kultur) mit einer einzelnen *E.coli* Kolonie wurde am nächsten Tag die Isolierung von Plasmid-DNA mit den Puffern des *GenElute HP Plasma Maxi-Kit* der Firma Sigma-Aldrich (Merck) durchgeführt.

Am Vortag der Isolierung wurde eine Starter-Kultur aus einer einzelnen Kolonie in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum inokuliert und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. 2 ml der inkubierten Zellsuspension wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 17.000 x g für 1 min bei 4°C zentrifugiert. Das

Zellsediment wurde mit 250 µl *Resuspension Solution* vermischt. Nach der Zugabe von 250 µl *Lysis Solution* zur alkalischen Lyse der Zellen wurde die Lösung invertiert und bei RT für 5 min inkubiert. In die Lösung wurden 350 µl *Neutralization Solution* gegeben, diese sehr gut vermischt und bei 17.000 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isomylalkohol versetzt, um die DNA zu extrahieren. Das Gemisch wurde sehr gründlich durchmischt und im Anschluss zentrifugiert (17.000 x g, 1 min, 4°C). Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml eiskaltem Ethanol zur Fällung der DNA vermischt. Nach einer Zentrifugation für 20 min (17.000 x g, 4°C) wurde der Überstand verworfen. Die sedimentierte Plasmid-DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (20 min, 17.000 x g, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Plasmid-DNA wurde zunächst Luft-getrocknet und anschließend in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Ob das Plasmid die richtige Sequenz besaß, wurde mit einer Testrestriktion und einer Sequenzierung überprüft

### **2.2.22 Isolierung von Plasmid-DNA**

Wurde in der Mini-DNA-Präparation ein Plasmid mit der gewünschten Sequenz aus einer *E.coli*-Mini-Kultur gewonnen, wurde diese Kultur zur Inokulation einer größeren Kultur (200 ml statt 5 ml) verwendet. Aus dieser können im Vergleich zur Mini-DNA-Präparation größere Mengen des Plasmids isoliert werden, wozu das *QIAfilter Plasmid Maxi Kit* verwendet wurde. Dabei wird nach einer alkalischen Lyse der Bakterien die DNA unter geringen Salzkonzentrationen und pH-Bedingungen an eine Säule gebunden. Nach mehrmaligem Waschen der Säule, um RNA, Proteine und andere Verunreinigungen zu entfernen, wird die Plasmid-DNA unter hohen Salzkonzentrationen eluiert und durch Fällung mit Isopropanol entsalzt.

200 ml LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum wurden mit 1 ml einer Mini-Kultur inokuliert und bei 37°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Alternativ wurden Bakterien, die das gewünschte Plasmid enthielten, aus einer Glycerol-Stammkultur im LB-Medium über Nacht kultiviert. Die Zellsuspension wurde in 50 ml-Röhrchen bei 4.500 x g für 30 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml *Buffer P1* resuspendiert. Nach der Zugabe von 10 ml *Buffer P2* wurde die Lösung mehrfach invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Zum Lysat wurden 10 ml gekühlter *Buffer P3* gegeben und mehrfach invertiert. Danach wurde das Lysat in den Zylinder des *QIAfilter Cartridge* gegossen und bei RT für 10 min inkubiert. In dieser Zeit wurde der *Qiagen-Tip 500* (im Weiteren als Säule bezeichnet) mit 10 ml *Buffer QBT* äquilibriert. Danach wurde das Zelllysate durch den Filter des *QIAfilter Cartridge* in die äquilibrierte Säule gedrückt. Nachdem das Lysat durch die Säule geflossen ist, wurde diese zweimal mit 30 ml *Buffer QC* gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 15 ml *Buffer QF* in ein neues 50 ml-Zentrifugenröhrchen. Durch

die Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und Zentrifugation bei 4.500 x g für 45 min wurde die Plasmid-DNA präzipitiert. Das Pellet wurde mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen und für 30 min bei 4.500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet an der Luft getrocknet, in 300 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und über Nacht bei 4°C gelöst. Am nächsten Tag wurde die Konzentration der Plasmid-DNA am Nanodrop bestimmt.

### **2.2.23 p21mRNA-Immunpräzipitation**

Durch die Immunpräzipitation (IP) der p21 mRNA sollen RNA-bindende Proteine (RBPs) nachgewiesen werden, welche dieses Transkript binden. Dazu muss zunächst ein markiertes Transkript, in diesem Fall eine mit 5-Bromouridine-5'-triphosphat (BrU) versehene p21 mRNA, *in vitro* synthetisiert werden. Diese mRNA wurde anschließend mittels 5'-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU)-Antikörpern, welche auch eine Affinität für BrU besitzen, an Protein G-Agarose *Beads* gebunden. Durch die Zugabe eines Zellextraktes konnten die RBPs aus diesem Extrakt an die p21 mRNA binden. Durch Waschschrte wurden zunächst nicht-spezifisch gebundene Proteine entfernt und im Anschluss die Transkripte mit den noch gebundenen RBPs durch die Zugabe von BrdU, welches eine höhere Affinität zu den BrdU-Antikörpern besitzt als BrU, eluiert. In einem SDS-Gel erfolgte die Überprüfung des Präzipitats auf Anwesenheit bestimmter Proteine. Die Immunpräzipitation wurde in verschiedenen Schritten durchgeführt, welche im Folgenden genauer beschrieben sind.

#### **2.2.23.1 Synthese BrU-markierter RNA**

Zunächst wurde die mit BrU-versehene RNA, die als Bindungsköder diente, mit dem *mMessage mMachine* Kit (Ambion/life technology) synthetisiert. Als Vorlage dienten Plasmide, die neben dem offenen Leserahmen (ORF) des p21 Gens entweder die 5' untranslatierte Region (UTR) (pcDNA4-5'UTR-FLAG-p21) oder die 3'UTR enthalten (pcDNA4-FLAG-p21-3'UTR) (Tabelle 12). Da das Kit ein Cap-Analog enthält, konnten RNAs mit einer 5'Cap-Struktur synthetisiert werden, welche die RNA vor einer Degradation durch Ribonukleasen schützt. So kann verhindert werden, dass die mRNAs ungewollt im weiteren Verlauf verkürzt werden und sich die Bindung von RBPs an die mRNA verändert.

Die Plasmide wurden zunächst ohne überhängende Enden (*blunt ends*) linearisiert. Dazu wurden je zweimal 5 µg Plasmid mit dem Enzym MssI (PmeI) für 3 h bei 37°C restringiert, um eine vollständige Linearisierung zu erreichen. Beide Reaktionen eines Plasmids wurden vereinigt und die linearisierte DNA wurde mit Ethanol gefällt. Dazu wurden die Reaktionen mit 1/20 Volumen EDTA (0,5 M, pH 8), 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und zwei Volumen Ethanol versetzt, für 15 min bei -20°C inkubiert und anschließend bei 17.000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die Pellets

wurden für einige Minuten an der Luft getrocknet und in Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O in einer Konzentration von 0,5-1 µg/µl resuspendiert. Die Linearisierung der Plasmide wurde in einem Agarosegel (Kapitel 2.2.20.3) überprüft. Im Anschluss daran wurde eine *Capped*-Transkription-Reaktion zur RNA-Synthese je linearisiertem Plasmid pipettiert und bei 37°C für 3 h inkubiert. Die *Capped*-Transkription-Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

Ad	20 µl	Nuklease-freies H <sub>2</sub> O
	10 µl	2x NTP/CAP
	2 µl	10x Reaction Buffer
	0,5-1 µg	Linearisierte DNA
	1 µl	BrUTP
	2 µl	Enzyme mix

### **2.2.23.2 Fällung von RNA mit Lithiumchlorid**

Die synthetisierte RNA wurde mit Lithiumchlorid gefällt. Dazu wurden die *Capped*-Transkription-Reaktionen (eine Reaktion pro Plasmid) jeweils mit 30 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O und 30 µl *Lithium Chloride Precipitation Solution* aus dem *mMessage mMachine* Kit versetzt, für 30 min bei -20°C inkubiert und anschließend bei 17.000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol in DEPC-H<sub>2</sub>O gewaschen und nach einer erneuten Zentrifugation in Abhängigkeit von der Pelletgröße in 10-20 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Konzentration und Reinheit wurde am Nanodrop bestimmt (1,5-2 µg/µl; A260/280=1,9-2,1; A260/230=2,0-2,2). Die RNA wurde in einer RNA-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.24) auf ihre Integrität überprüft, um zum einen die Größe der RNA-Moleküle mit Hilfe eines ebenfalls aufgetragenen Größenstandards zu bestimmen und um eine unerwünschte Degradation (Auftreten von unscharfen Banden) auszuschließen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

### **2.2.23.3 IP der p21 mRNA**

In den nächsten Arbeitsschritten folgte die Ko-IP der p21 mRNA mit den daran gebundenen Proteinen mit dem RiboTrap Kit (MBL). Verschiedene im Kit enthaltene Puffer wurden kurz vor Gebrauch nach Herstellerangaben mit Protease- und RNase-Inhibitoren sowie mit DTT versetzt. Im Weiteren wird dieses mit folgendem Symbol (+) gekennzeichnet.

Um die BrdU-Antikörper an die Protein G-Agarose *Beads* zu koppeln, wurden die *Beads* dreimal mit Nuklease-freiem PBS gewaschen und pro IP in 100 µl in einer 50:50 *Beads*/PBS-Mischung aliquotiert. Zusätzlich wurde ein Aliquot für die Aufreinigung des zytoplasmatischen Extraktes zurück behalten. Zu jeder Reaktion wurden 500 µl *Beads Wash Buffer* (+) und 50 µl Anti-BrdU-Antikörper gegeben und für mindestens 1 h bei 4°C rotierend inkubiert. Im Anschluss wurden die *Beads* mit 1 ml *Beads Wash Buffer* (+) gewaschen. Um eine Bindung der BrU-markierte RNA an die *Beads* zu ermöglichen, wurden die Antikörper-gekoppelten *Beads* in 500 µl *Beads Wash Buffer* (+) mit 50 pmol



BrU-markierter RNA und RNase-Inhibitor (200 U/ml) für 2-3 h bei 4°C rotiert. Die *Beads* wurden erneut mit 500 µl *Beads Wash Buffer* (+) gewaschen und der Überstand verworfen.

In der Inkubationszeit der Antikörper-gekoppelten *Beads* mit der BrU-markierten RNA wurde das zytoplasmatische Extrakt vorbereitet. Am Vortag wurden acht 14 cm Zellkulturschalen mit  $5 \times 10^6$  Zellen pro Schale ausgesät und über Nacht bei 37°C (5%CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber geerntet, in 50 ml-Zentrifugationsröhrchen gesammelt und bei 300 x g für 5 min bei 4°C präzipitiert. Das Zellpellet wurde dreimal mit eiskaltem Nuklease-freiem PBS gewaschen, in 1-1,5 ml PBS resuspendiert und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet in 1200 µl *CE-Buffer* (+) gründlich resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Zum resuspendierten Pellet wurden 60 µl *Detergent solution* zugegeben und die Lösung wurde invertiert. Zum Pelletieren der Nuclei wurde bei 3000 x g für 3 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand, welcher das zytoplasmatische Extrakt darstellt, wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, 36 µl *High-salt solution* zugegeben und invertiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (12.000 x g, 3 min, 4°C) wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration im Überstand mittels Bradford Assay (s. Kapitel 2.2.11) bestimmt. Im Anschluss wurde das sogenannte *Preclearing* durchgeführt, in dem das zytoplasmatische Extrakt zu den zu Beginn zurück behaltenen *Beads* gegeben und 1 h bei 4°C rotiert wurde. So können Faktoren, die unspezifisch an die *Beads* binden, aus dem Extrakt entfernt werden, sodass es bei der Zugabe des Extrakts zur RNA nur zu spezifischen Bindungen an diese kommt. Nach dem *Preclearing* wurden die *Beads* präzipitiert, das zytoplasmatische Extrakt aliquotiert und zu der BrU-markierten RNA an den BrU-Antikörper-gekoppelten *Beads* gegeben. Nach einer Inkubation unter Rotation von 2 h bei 4°C wurden die *Beads* sedimentiert und der Überstand verworfen. Die RBP/BrU-markierten RNA-Komplexe an den BrU-Antikörper-gekoppelten *Beads* wurden viermal mit 1 ml Wash Buffer (+) gewaschen und der Überstand verworfen. Zur Elution der spezifisch gebundenen Proteine wurden die *Beads* in 200 µl Nuklease-freien PBS resuspendiert und in eine Zentrifugationssäule mit Bodenverschluss überführt. Der Bodenverschluss wurde geöffnet und die Säule in ein Zentrifugenröhrchen platziert. Nach Zentrifugation (1.000 x g, 30 sec, 4°C) wurde der Bodenverschluss wieder aufgesetzt, 50 µl *Elution Buffer* (4 µl BrdU/DMSO in 100 µl Nuklease-freiem PBS) zu den *Beads* gegeben und für 30 min unter Schütteln bei 4°C inkubiert. Der Bodenverschluss wurde geöffnet, die Säule in ein Zentrifugenröhrchen platziert und die RBP/BrU-markierten RNA-Komplexe wurden durch Zentrifugation (1.000 x g, 1 min, 4°C) eluiert. Um die Ausbeute zu erhöhen wurde die Zugabe des *Elution Buffer* wiederholt. Die Eluate aus beiden Schritten wurden

vereinigt und mit einer geeigneten Menge an SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95°C aufgekocht und auf ein SDS-Gel aufgetragen (Kapitel 2.2.12).

### **2.2.24 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese**

#### **10x MOPS-Elektrophorese-Puffer**

0,2 M MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure) (pH 7,0)  
20 mM Natriumacetat  
10 mM EDTA

#### **DEPC-H<sub>2</sub>O**

0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC)  
in H<sub>2</sub>O  
gerührt über Nacht unter dem Abzug  
autoklaviert

Um die Größe von RNA-Fragmenten zu bestimmen, wurde diese unter denaturierenden Bedingungen in einem Agarosegel getrennt. Durch die Denaturierung mittels Formaldehyd werden die Sekundärstrukturen der RNA aufgelöst, damit die RNA als Einzelstrang-Molekül entsprechend der Basenpaargröße aufgetrennt werden kann. Es wurde DEPC-H<sub>2</sub>O verwendet, da durch die Inkubation mit DEPC im Wasser vorhandene Ribonukleasen inaktiviert werden.

Für das Gel wurden 0,4 g Agarose mit 24,8 ml DEPC-H<sub>2</sub>O aufgekocht. Nachdem die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt war, wurde 4 ml 10 MOPS-Elektrophorese-Puffer und 7,2 ml Formaldehyd (37%; Endkonzentration 2,2M) zugegeben. Anschließend wurde das Volumen mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 40 ml aufgefüllt. Alle Komponenten der Lösung wurden durch Schwenken vermischt und die Lösung in eine Gelapparatur gegossen, in der das Agarosegel für eine Stunde polymerisierte. 2 µg der einzelnen Proben wurden mit gleicher Menge 2x RNA Loading Dye (geliefert mit *RiboRuler High Range RNA Ladder*) versetzt, der Ethidiumbromid zur Visualisierung der RNA unter UV-Licht enthält. Für den Größenstandard wurden 10 µl *RiboRuler High Range RNA Ladder* mit 10 µl 2x RNA Loading Dye vermischt. Größenstandard und RNA wurden zunächst 10 min bei 70°C und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Zur Äquilibration des Agarosegels wurde zunächst für 10 min eine Spannung von 100 Volt angelegt. Die vorbereiteten RNA-Proben und der Größenstandard wurden auf das Gel aufgetragen und erneut eine Spannung von 100 Volt angelegt. Die Auftrennung wurde photographisch unter UV-Licht (UV-Flächenstrahler NU-72) dokumentiert.

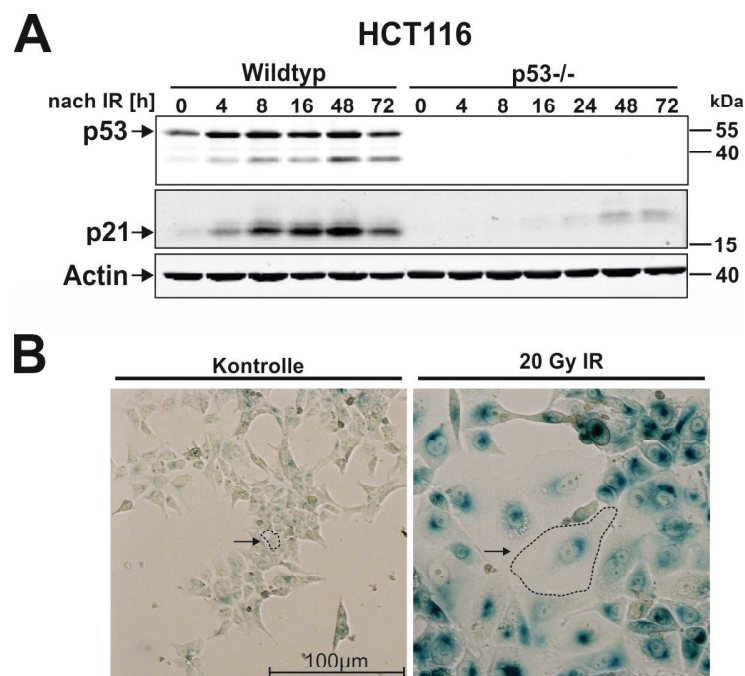
### **2.2.25 Statistik**

Für alle statistischen Analysen wurde ein gepaarter, zweiseitiger *Student's t-test* verwendet. Die Signifikanzgrenzen wurden wie folgt festgelegt: \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\*p<0,001.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der IR-induzierten Schädigungsantwort von HCT116-Zellen

Durch ionisierender Röntgenstrahlung (IR)-induzierte Schädigung kommt es zu zahlreichen Phosphorylierungen von p53 durch die Kinasen ATM und Chk1/2. Dies führt dazu, dass p53 durch die Ubiquitin-Ligasen HDM2 und HDMX nicht mehr für den proteasomalen Abbau markiert wird und so die p53-Proteinexpression stabilisiert wird. In Folge dieser Erhöhung und Aktivierung von p53 kommt es zur transkriptionellen Induktion von p53-Zielgenen wie z.B. p21. Die Aktivierung des p53-p21-Signalweges führt in der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116, welche hauptsächlich in dieser Arbeit verwendet wurde, zur Einleitung von Seneszenz (Sohn et al., 2006). Um dieses Verhalten im Rahmen dieser Arbeit zu validieren, wurden HCT116 Wildtyp-Zellen IR mit einer Dosis von 20 Gy ausgesetzt, um DNA-Doppelstrangbrüche hervorzurufen (Vignard et al., 2013). Western Blot-Analysen bestätigten nicht nur die Stabilisierung der p53-Proteinexpression, sondern auch die Induktion der p21-Proteinexpression (Abbildung 9A). Darüber hinaus leitete die Behandlung mit IR in HCT116 Wildtyp-Zellen Seneszenz ein. Dies konnte,



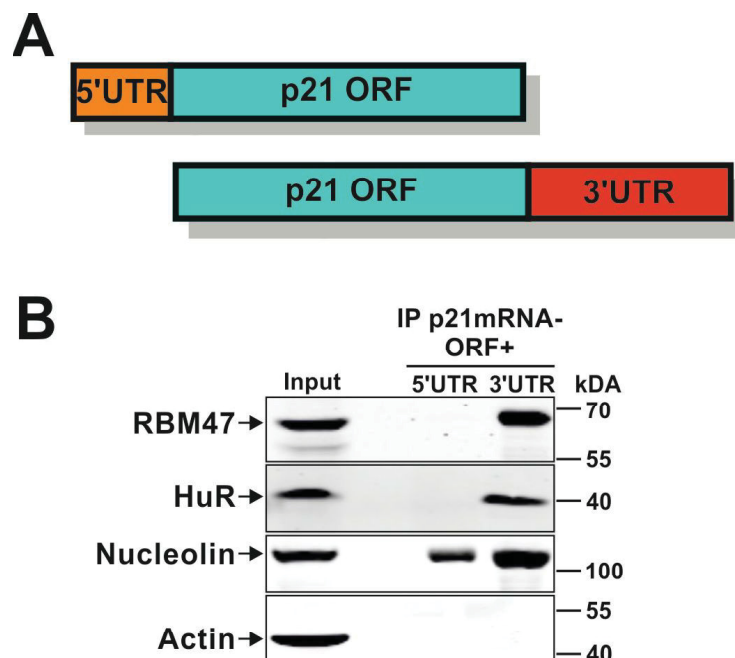
**Abbildung 9: Induktion von p53 und p21 durch IR und die daraus folgende Seneszenzantwort.**

(A) Zellextrakte von unbestrahlten und bestrahlten (20 Gy) HCT116 Wildtyp- und p53<sup>-/-</sup>-Zellen wurden mittels Western Blot analysiert. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach IR geerntet. Actin diente als Ladekontrolle. (B) Fünf Tage nach der Bestrahlung mit 20 Gy wurden HCT116 Wildtyp-Zellen fixiert und die SA-β-Gal-Aktivität durch kolorimetrische Färbung mittels X-Gal visualisiert. Die Färbung wurde mit einem Mikroskop dokumentiert. In beiden Bildern wurde eine Zelle mit einem Pfeil markiert und ihr Umriss mit einer schwarz-gestrichelten Linie hervorgehoben, um die deutliche Größenzunahme seneszenten Zellen darzustellen. Die Blots bzw. Bilder sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

neben der Expression der Mediatoren der Seneszenz p53 und p21, durch eine Zunahme des Zellumfangs und den Anstieg der Aktivität der Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal) nachgewiesen werden (Abbildung 9B). Im Gegensatz dazu nahm in den HCT116 p53-defizienten (p53<sup>-/-</sup>)-Zellen, die p21-Proteinexpression nach Bestrahlung in einem deutlich geringeren Ausmaß zu (Abbildung 9A), sodass kein Zellzyklusarrest, sondern Apoptose eingeleitet wird (Sohn et al., 2006).

### 3.2 Verifizierung der Bindung von RBM47 an die p21 mRNA

In Vorarbeiten zu dieser Dissertation konnte im Labor für Molekulare Radioonkologie RBM47 als neues p21 mRNA-bindendes Protein in einer massenspektrometrischen Analyse identifiziert werden (Kapitel 1.5). Diese Beobachtung sollte nun zunächst mittels einer p21 mRNA-IP im Rahmen dieser Arbeit verifiziert werden. Dazu wurde *in vitro* transkribierte p21 mRNA, die neben dem p21-ORF entweder die 5'UTR (p21-5'UTR mRNA) oder die 3'UTR (p21-3'UTR mRNA) der p21 mRNA enthielt (Abbildung 10A), mit Extrakten von HCT116 Wildtyp-Zellen inkubiert und anschließend immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden im Western Blot auf die Anwesenheit von ko-immunpräzipitierten Proteinen analysiert (Abbildung 10B). RBM47 konnte nur in Präzipitaten der p21-3'UTR mRNA nachgewiesen werden, allerdings nicht in denen der p21-5'UTR mRNA. Ebenfalls wurde das bekannte p21 mRNA-bindende Protein HuR, welches die p21-3'UTR bindet (Lal et al., 2004; Wang et al., 2000; Yano et al., 2005), an



**Abbildung 10: RBM47 bindet an die p21 mRNA in Abhängigkeit von der 3'UTR.**

Der ORF der p21 mRNA wurde entweder mit der 5'UTR oder 3'UTR (A) *in vitro* transkribiert und dabei mit BrU markiert. Die markierte p21 mRNA wurde mit Extrakten von HCT116 Wildtyp-Zellen inkubiert und mit BrdU-Antikörpern immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden mittels Western Blot für die oben-stehenden Proteine analysiert (B). Nucleolin diente als Positiv-Kontrolle, da es beide Transkripte bindet. Die gezeigten Western Blots sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

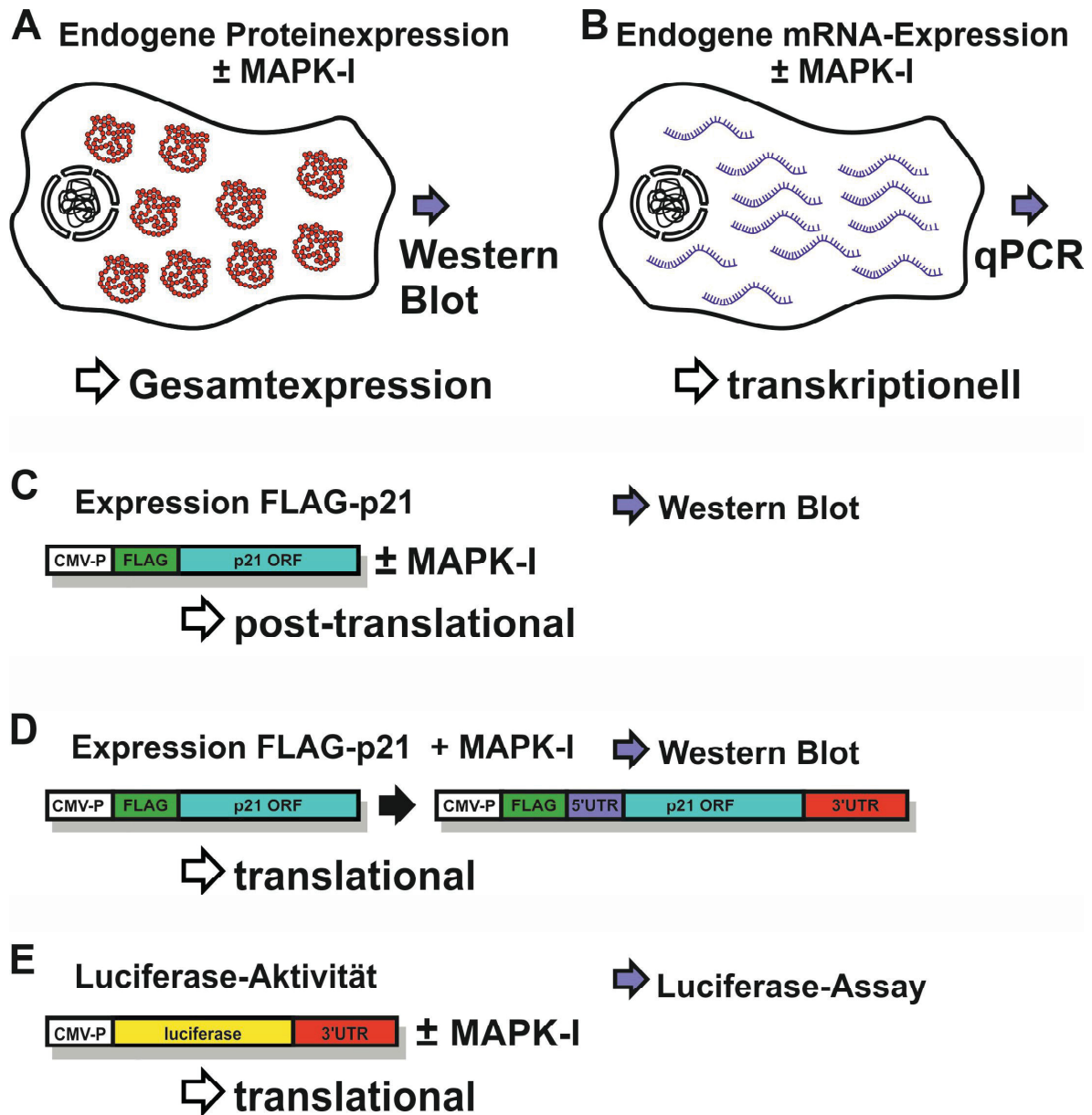
der p21-3'UTR mRNA angereichert und diene daher als Positiv-Kontrolle. Im Gegensatz dazu konnte das nukleare Phosphoprotein Nucleolin, welches mit einer Vielzahl von mRNAs interagiert (Scott & Oeffinger, 2016) und diese auch in der codierenden Region binden kann (Abdelmohsen et al., 2011), in den Präzipitaten der p21-5'UTR mRNA und p21-3'UTR mRNA nachgewiesen werden. Es wurde bereits gezeigt, dass Nucleolin beide Transkripte bindet (Peters et al., 2017). Actin konnte als Negativ-Kontrolle nur im Input nachgewiesen werden. So konnte verifiziert werden, dass RBM47 3'UTR-abhängig an die p21 mRNA bindet.

### **3.3 MAPK regulieren die p21-Expression auf verschiedenen Ebenen**

Da solche 3'UTR-abhängigen Bindungen von RBPs an mRNAs auf eine translationale Kontrolle schließen lassen, sollte zunächst überprüft werden, ob hierbei MAPK beteiligt sind. Denn MAPK können sowohl die Expression von p21, als auch die Expression, Funktion und Lokalisation von RBPs regulieren (Kapitel 1.4.4 und 1.4.5). Daher sollte untersucht werden, ob RBM47 eine Rolle in der MAPK-vermittelten p21-Regulation spielt. Dabei war es zunächst das Ziel, herauszufinden, welche MAPK in HCT116-Zellen die Expression von p21 auf translationaler Ebene kontrolliert.

Der Einfluss der drei MAPK ERK, JNK und p38 auf die Proteinexpression von p21 wurde parallel anhand folgender Vorgehensweisen analysiert, welche schematisch in Abbildung 11 dargestellt sind. Zunächst wurden HCT116 Wildtyp-Zellen mit einem ausgewählten MAPK-Inhibitor (MAPK-I) inkubiert und anschließend bestrahlt (20 Gy), um dadurch die Expression von p21 zu induzieren (Abbildung 11A). In Western Blot-Analysen wurde anschließend untersucht, ob sich die Expression von p21 durch den Einsatz der Inhibitoren verändert hat und damit eine Regulation von p21 durch die MAPK besteht. Im Anschluss wurden weitere Analysen durchgeführt, die Rückschlüsse auf die Regulationsebene – Transkription, Translation, Post-Translation – zulassen, auf der die p21-Expression durch MAPK gesteuert wird. So wurden transkriptionelle Einflüsse der MAPK mittels quantitativer Bestimmung der p21 mRNA-Expression nach Inhibitor-Behandlung und Bestrahlung durch qPCR-Analysen nachgewiesen (Abbildung 11B). Ein post-translationaler Effekt wurde anhand von Expressionsunterschieden eines konstitutiv-exprimierten FLAG-p21-Konstruktes, welches nur den FLAG-markierten p21-ORF enthält (FLAG-p21-ORF), in Inhibitor-behandelten und –unbehandelten Zellen bestimmt (Abbildung 11C). Veränderten die MAPK-Inhibitoren dagegen die Expression eines FLAG-p21-Konstrukts, welches neben dem p21-ORF zusätzlich die p21-5'UTR und -3'UTR enthält (FLAG-p21-5'3'UTR), im Vergleich zum p21-ORF-Konstrukts, konnte von einer translationalen Kontrolle ausgegangen werden (Abbildung 11D). Um einen potentiellen





**Abbildung 11: Schematische Analyse der p21-Expression unter dem Einfluss von MAPK-I**

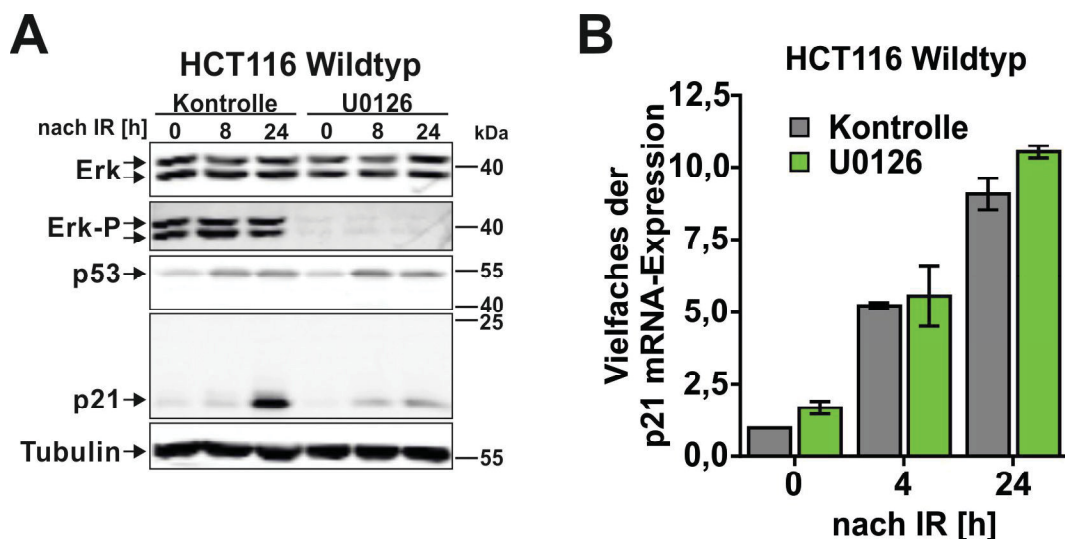
(A) Um die p21-Expression zu untersuchen, wurden Zellen mit einem MAPK-I inkubiert und mit 20 Gy IR bestrahlt. Zu den verschiedenen Analysezeitpunkten wurden Zellextrakte gewonnen und die Expression von p21 mittels Western Blot analysiert. (B) Die Zellen wurden wie in A mit MAPK-I und IR behandelt. Um die p21 mRNA-Expression zu untersuchen, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten RNA isoliert und die Expression der p21 mRNA durch den Einsatz von qPCR quantifiziert. (C) Zellen wurden mit einem FLAG-p21-Konstrukt transfiziert, welches nur den p21-ORF enthält, und wurden mit einem MAPK-I behandelt oder blieben unbehandelt. Die Expression von FLAG-p21 wurde im Western Blot analysiert und quantifiziert. Eine Veränderung der Expression in Anwesenheit des Inhibitors deutet auf einen post-translationalen Effekt durch den MAPK-I hin. (D) Die Zellen wurden mit einem FLAG-p21-Konstrukt transfiziert, welches entweder nur den p21-ORF oder zusätzlich die p21-5'UTR und die p21-3'UTR enthält, und mit einem MAPK-I behandelt. Die Expression von FLAG-p21 wurde im Western Blot analysiert und quantifiziert. Eine Veränderung der Expression zwischen dem p21-ORF- und p21-UTR-Konstrukt deutet auf einen translationalen Effekt durch den MAPK-I hin. (E) Die Zellen wurden mit einem Luciferase-Konstrukt transfiziert, welches das Luciferase-Gen unter der Kontrolle eines konstitutiv-exprimierenden CMV-Promotor und mit nachgeschalteter p21-3'UTR enthält. Die Zellen wurden mit einem MAPK-I behandelt und wurden zusätzlich bestrahlt. 24 h nach der Bestrahlung wurde die Luciferase-Aktivität gemessen.



translationalen Effekt zu verifizieren und besser quantifizieren zu können, wurde zusätzlich ein Luciferase-Assay verwendet (Abbildung 11E). Das eingesetzte Luciferase-Konstrukt enthält nach dem konstitutiv exprimierten *Firefly*-Luciferase-Gen die 3'UTR des p21-Gens. Die Aktivität der Luciferase in An- und Abwesenheit des Inhibitors lässt Rückschlüsse auf eine translationale Regulation der p21-Expression durch die MAPK zu. Anhand dieser Vorgehensweisen wurden die in den folgende Abschnitten (Kapitel 3.3.1, 3.3.2 und 3.3.3) dargestellten Ergebnisse erzielt.

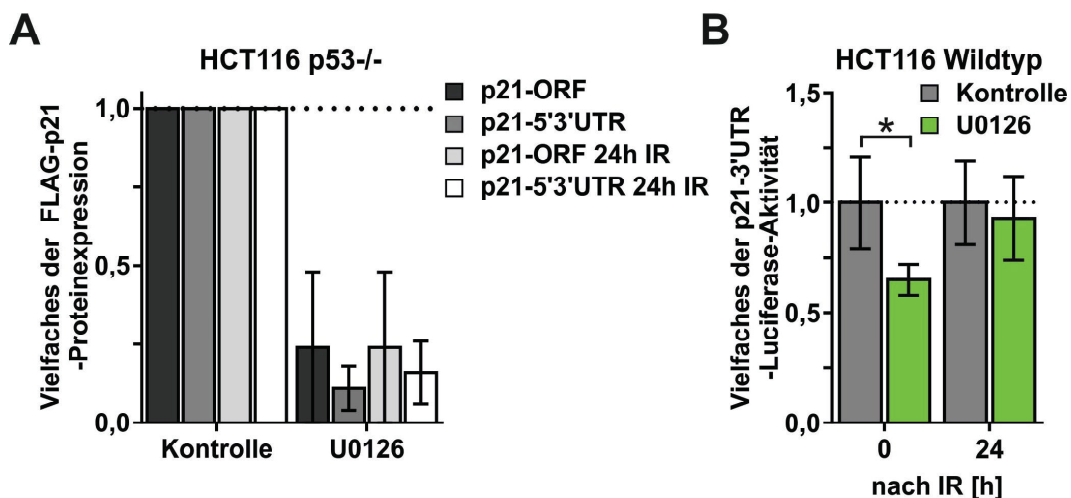
### 3.3.1 ERK reguliert die p21-Expression auf post-translationaler Ebene

Zur Analyse des Effekts der MAPK ERK auf die p21-Expression wurde der Inhibitor U0126 eingesetzt. U0126 ist ein nicht-kompetitiver Inhibitor der ERK-MAPKK MEK1 und MEK2 (Favata et al., 1998), der eine aktivierende Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 verhindert. Um zu überprüfen, ob die Inhibition von ERK einen Effekt auf die p21-Expression besitzt, wurden HCT116 Wildtyp-Zellen mit U0126 behandelt und mit 20 Gy bestrahlt. Die Expression verschiedener Proteine wurde im Western Blot analysiert. Während U0126 die Gesamtexpression von ERK weder in unbestrahlten, noch in bestrahlten Zellen veränderte, wurde dessen Phosphorylierung vollständig inhibiert (Abbildung 12A), wodurch die Funktionalität dieses Inhibitors bestätigt wurde. Wie erwartet nahm die p53-Expression nach Bestrahlung zu, aber veränderte sich nicht durch den Einsatz von U0126. Im Gegensatz hierzu supprimierte U0126 sowohl die basale, als auch die bestrahlungsinduzierte p21-Proteinexpression (Abbildung 12A). Allerdings hatte der Inhibitor keinen Einfluss auf die p21 mRNA-Expression (Abbildung 12B).



**Abbildung 12: Der ERK-Inhibitor U0126 supprimiert die bestrahlungsinduzierte p21-Proteinexpression.** HCT116 Wildtyp-Zellen wurden mit dem ERK-Inhibitor U0126 (20  $\mu$ M) inkubiert und 45 min nach der Zugabe mit 20 Gy IR bestrahlt. **(A)** Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellextrakte gewonnen und diese mittels Western Blot auf die Anwesenheit von ERK, phosphoryliertem ERK (ERK-P), p53 und p21 analysiert. Tubulin diente als Ladeprotein. Die gezeigten Western Blots sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente. **(B)** Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA der Zellen isoliert und mittels qPCR wurde die mRNA-Expression von p21 analysiert. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens fünf unabhängig durchgeführten Experimenten.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ERK die p21-Proteinexpression auf (post-)translationaler Ebene reguliert, weshalb in nachfolgenden Experimenten die Expression verschiedener FLAG-p21-Konstrukte unter Inhibitorerfluss analysiert wurde. Unabhängig von der An- oder Abwesenheit der 5'- und 3'UTRs wurde die Expression beider FLAG-p21-Konstrukte sowohl unter basalen Bedingungen, als auch nach Bestrahlung durch U0126 stark inhibiert (Abbildung 13A). Dies deutet auf einen starken post-translationalen Effekt unabhängig von den p21-UTRs hin. Zwar scheint die Expression der p21-UTR-Konstrukte im Vergleich zum ORF-Konstrukt unter Inhibitor-Behandlung noch weiter abzunehmen, jedoch erschweren die hohen Standardabweichungen eine konkrete Aussage. Die Luciferase-Aktivität nahm zwar in Abwesenheit einer DNA-Schädigung (0 h IR) in Abhängigkeit der p21-3'UTR durch Behandlung mit dem Inhibitor ab, zeigte aber nach IR (24 h) keine Veränderung (Abbildung 13B). Zwar deutet dies auf einen zusätzlichen translationalen Effekt von ERK auf die p21-Expression in Abhängigkeit von der p21-3'UTR hin. Allerdings ist in diesem zellulären Kontext dieser Einfluss auf Grund der starken post-translationalen Abnahme der Expression der p21-FLAG-p21-Konstrukte wahrscheinlich nur von geringer regulatorischer Bedeutung, da die post-translationale Regulation den translationalen Effekt überdeckt.



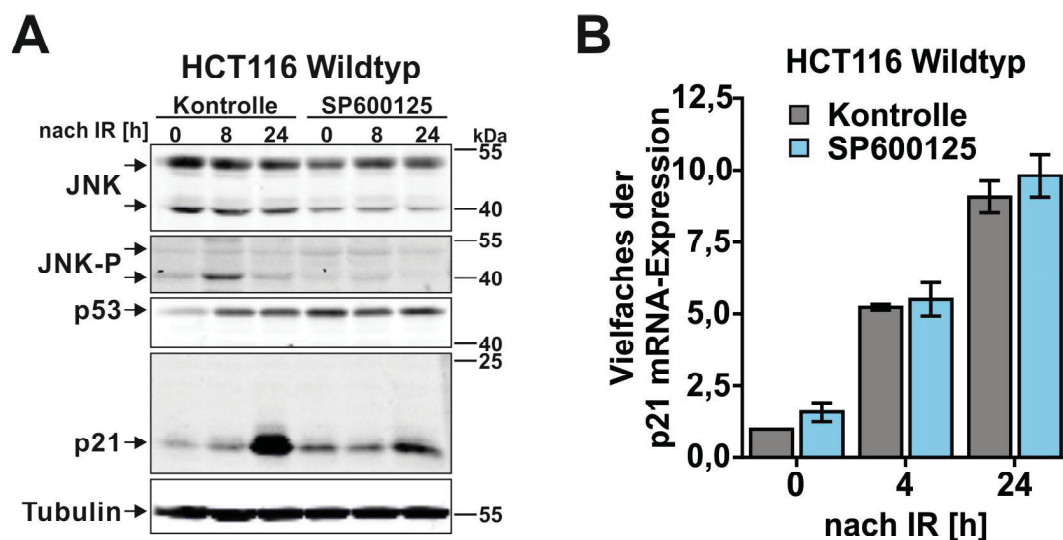
**Abbildung 13: Der ERK-Inhibitor U0126 verringert die p21-Expression in Abhängigkeit vom p21-ORF.**

(A) HCT116 p53<sup>-/-</sup>-Zellen wurden mit den genannten Plasmidkonstrukten transfiziert, die den p21-ORF ± 5'-3'UTR enthalten. 45 min nach Zugabe von U0126 (20 µM) wurden die Zellen 20 Gy IR ausgesetzt (24 h IR) oder blieben unbehandelt (0 h IR). 24 h nach der Bestrahlung wurden die Zellextrakte gewonnen und mittels Western Blot auf die Expression von FLAG-p21 analysiert. Diese wurde densitometrisch quantifiziert. (B) HCT116 Wildtyp-Zellen wurden mit Luciferase-Konstrukten transfiziert, die neben dem Luciferase-Gen zusätzlich die p21-3'UTR enthalten. Die Zellen wurden mit U0126 inkubiert, 45 min später bestrahlt (24 h IR) oder blieben unbehandelt (0 h IR). 24 h nach IR wurde die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus vier unabhängig durchgeführten Experimenten.

### 3.3.2 Der JNK-Inhibitor SP600125 verringert die p21-Proteinexpression

SP600125 ist ein reversibler ATP-kompetitiver JNK-Inhibitor, der JNK-1, -2 und -3 inhibiert und so die Phosphorylierung von c-Jun hemmt. Interessanterweise wird die Phosphorylierung von JNK ebenfalls gehemmt. Die Ursache hierfür könnte in der

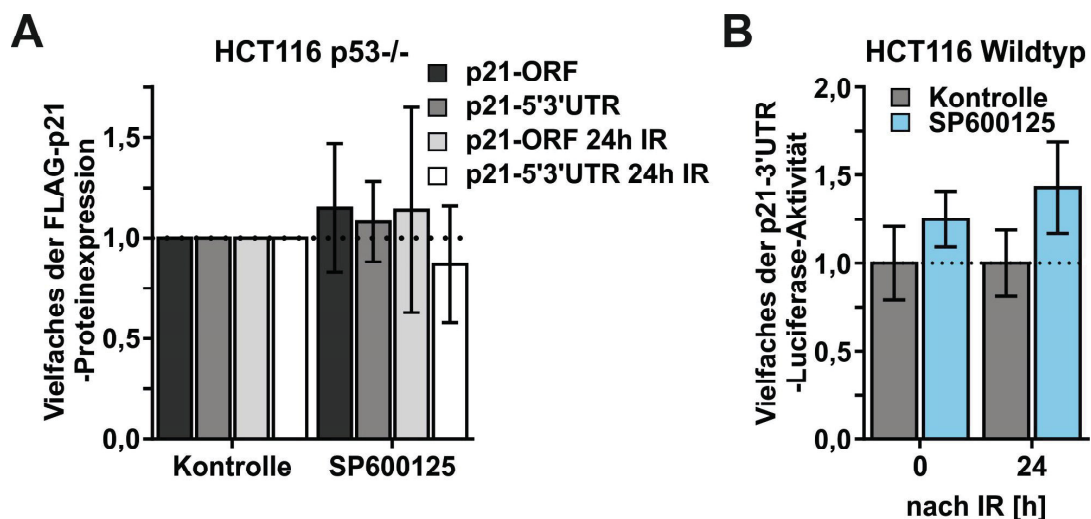
inhibitorischen Aktivität von SP600125 gegen die JNK-MK MMK4 liegen, wobei die Selektivität des Inhibitors gegenüber MMK4 im Vergleich zu JNK jedoch um das 10-fache erniedrigt ist, oder in der Inhibition der Autophosphorylierung von JNK begründet sein (Bennett et al., 2001). Dieser Effekt von SP600125 konnte auch in weiteren Publikationen bestätigt werden (Amagasaki et al., 2006; Gong et al., 2006; Liu et al., 2010; Pei et al., 2003), weshalb er zur Überprüfung der Wirksamkeit des Inhibitors geeignet ist. Auch in dieser Dissertation konnte die Inhibition der JNK-Phosphorylierung durch SP600125 gezeigt und damit dessen Funktionalität verifiziert werden (Abbildung 14A). Während die basale p21-Proteinexpression durch den Einsatz von SP600125 leicht anstieg, wurde diese 24h nach Bestrahlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen deutlich supprimiert (Abbildung 14A). Interessanterweise erhöhte SP600125 selbst in Abwesenheit eines DNA-Schadens (0 h IR) die p53-Proteinexpression, während der Inhibitor jedoch in bestrahlten Zellen keinen zusätzlichen Effekt besaß. Diese Zunahme der p53-Expression könnte die Ursache für den basalen Anstieg der p21-Proteinexpression nach Behandlung mit SP600125 sein. Dieser Regulationsmechanismus spiegelte sich auch auf mRNA-Ebene wider. Unter Kontrollbedingungen nahm die p21 mRNA-Expression nach Einsatz von SP600125 leicht zu (Abbildung 14B), vermutlich auf Grund der erhöhten p53-Expression. Nach Bestrahlung veränderte sich die p21 mRNA-Expression, die durch die Behandlung mit IR induziert wurde, durch den Inhibitor allerdings nicht (Abbildung 14B), weshalb ein transkriptioneller Effekt auszuschließen ist.



**Abbildung 14:** Der JNK-Inhibitor SP600125 verringert die p21-Proteinexpression unabhängig von der mRNA-Expression.

HCT116 Wildtyp-Zellen wurden mit dem JNK-Inhibitor SP600125 (20  $\mu$ M) behandelt und 45 min nach der Zugabe mit 20 Gy IR bestrahlt. (A) Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellextrakte gewonnen und mittels Western Blot auf die Anwesenheit von JNK, phosphoryliertem JNK (JNK-P), p53 und p21 analysiert. Tubulin diente als Ladekontrolle. Die gezeigten Western Blots sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente. (B) Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA der Zellen isoliert und mittels qPCR die mRNA-Expression von p21 analysiert. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens fünf unabhängig durchgeführten Experimenten.

Wider Erwarten konnten aber auch bei der Expression von FLAG-p21 keine Unterschiede beobachtet werden. Die Expression des FLAG-p21-ORF-Konstruktes veränderte sich weder basal, noch nach DNA-Schädigung durch den Einsatz des Inhibitors (Abbildung 15A), sodass ein post-translationaler Effekt, der am ORF wirkt, ebenfalls auszuschließen ist. Darüber hinaus unterschied sich die Expression der FLAG-p21-ORF- und FLAG-p21-5'3'UTR-Konstrukte in Anwesenheit von SP600125 nicht, was gegen einen 3'UTR-abhängigen translationalen Effekt spricht. Im Gegensatz dazu nahm im Luciferase-Assay, in dem die Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit von der p21-3'UTR gemessen wird, die Aktivität mit SP600125 nach Bestrahlung leicht zu (Abbildung 15B). Dies deutet allerdings auf eine translationale Regulation hin, die außerdem auch der Reduktion der p21-Proteinexpression durch den Einsatz des JNK-Inhibitors entgegensteht. Daher konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden, auf welcher Ebene JNK die p21-Proteinexpression beeinflusst.



**Abbildung 15: Der JNK-Inhibitor SP600125 verändert die Expression von FLAG-p21 nicht.**

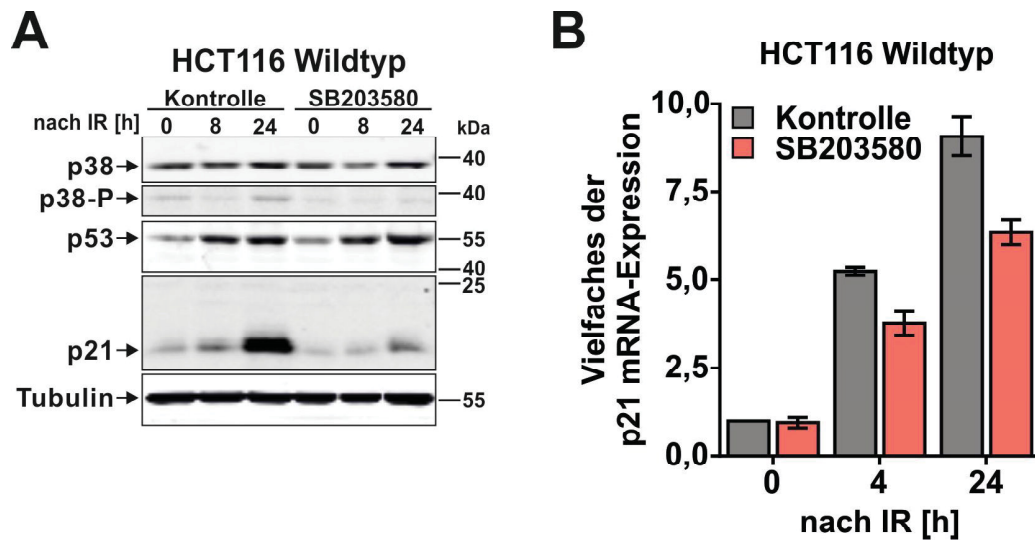
(A) HCT116 p53<sup>-/-</sup>-Zellen wurden mit den genannten Plasmidkonstrukten transfiziert, die den p21-ORF ± 5'3'UTR enthalten. 45 min nach Zugabe von SP600125 (20 µM) wurden die Zellen 20 Gy IR ausgesetzt (24 h IR) oder blieben unbehandelt (0 h IR). 24 h nach der Bestrahlung wurden die Zellextrakte gewonnen und mittels Western Blot auf die Expression von FLAG-p21 analysiert. Diese wurde densitometrisch quantifiziert. (B) HCT116 Wildtyp-Zellen wurden mit Luciferase-Konstrukten transfiziert, die neben dem Luciferase-Gen zusätzlich die p21-3'UTR enthalten. Die Zellen wurden mit SP600125 inkubiert, 45 min später bestrahlt (24 h IR) oder blieben unbehandelt (0 h IR). 24 h nach IR wurde die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus vier unabhängig durchgeführten Experimenten.

### 3.3.3 Die MAPK p38 reguliert die p21-Expression auf translationaler Ebene

Als Inhibitor für den p38-MAPK-Signalweg wurde SB203580 eingesetzt (Cuenda et al., 1995; Lee et al., 1994), welcher die Aktivität von p38 supprimiert, im dem dieser kompetitiv die ATP-Bindungsstelle besetzen kann (Young et al., 1997). Allerdings wird dadurch auch die Aktivierung von p38 selbst reduziert, da der Inhibitor die inaktive Form von p38 bindet und so dessen Phosphorylierung verhindert (Frantz et al., 1998). Die Funktionalität von SB203580 konnte in dieser Arbeit durch Inhibition der p38-Phosphorylierung bestätigt werden (Abbildung 16A). Während die p53-Proteinexpression



nach Stimulation mit IR wie erwartet zunahm, veränderte sich dieser Anstieg durch die Behandlung mit SB203580 nicht (Abbildung 16A). Im Gegensatz zur p53-Expression nahm die Induktion der p21-Proteinexpression nach Bestrahlung durch den Einsatz des p38-Inhibitors stark ab (Abbildung 16A). Übereinstimmend mit dieser Beobachtung wurde durch SB203580 auch die bestrahlungsinduzierte p21 mRNA-Expression reduziert (Abbildung 16B). Dies könnte entweder auf eine veränderte Transkription oder auf eine Modifizierung der mRNA-Stabilität, also einer translationalen Regulation, zurück zu führen sein.

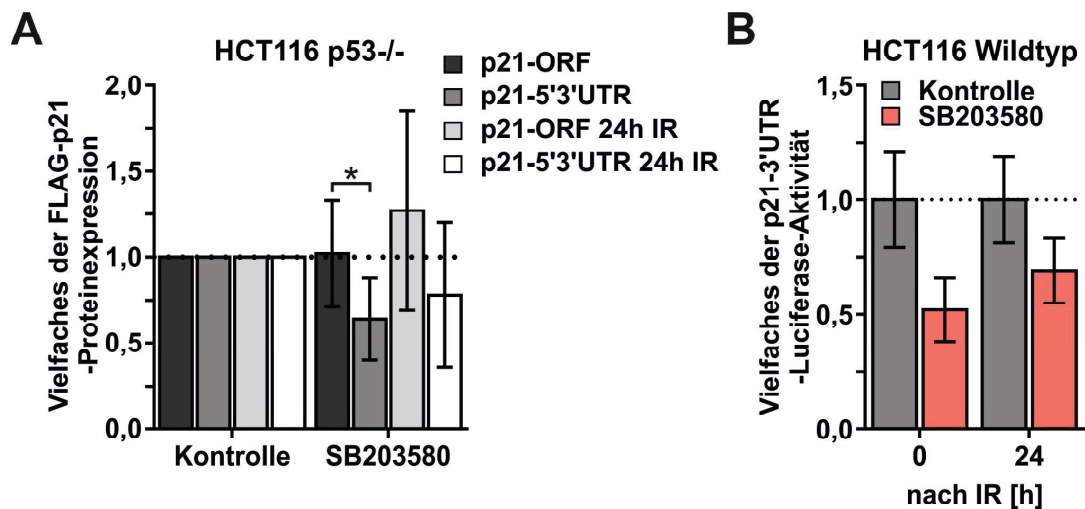


**Abbildung 16:** Der p38-Inhibitor SB203580 verringert die p21-Proteinexpression und p21 mRNA-Expression.

HCT116 Wildtyp-Zellen wurden mit dem p38-Inhibitor SB203580 (20  $\mu$ M) inkubiert und 45 min nach der Zugabe mit 20 Gy IR bestrahlt. (A) Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellextrakte gewonnen und mittels Western Blot auf die Anwesenheit von p38, phosphoryliertem p38 (p38-P), p53 und p21 analysiert. Tubulin diente als Ladegesteuer. Die gezeigten Western Blots sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente. (B) Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA der Zellen isoliert und mittels qPCR die mRNA-Expression von p21 analysiert. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens fünf unabhängig durchgeführten Experimenten.

Die Expression des FLAG-p21-ORF veränderte sich in An- und Abwesenheit des Inhibitors nicht, sodass angenommen werden kann, dass ein post-translationaler Effekt nicht die Ursache für die Reduktion der endogenen p21-Proteinexpression ist (Abbildung 17A). Im Gegensatz dazu nimmt die Expression des FLAG-p21-5'3'-Konstrukts im Vergleich zum p21-ORF-Konstrukt unter Inhibitor-Einfluss sowohl basal, als auch nach DNA-Schädigung ab (Abbildung 17A). Da das Vorhandensein der UTRs die einzige Variable darstellt, wird die Regulation in Abhängigkeit dieser vermittelt, was auf einen translationalen Mechanismus durch p38 schließen lässt. Dieser translationale, p21-UTR-abhängige Effekt konnte durch die Analyse der Luciferase-Aktivität eines Konstrukts, welches nach dem Luciferase-Gen die p21-3'UTR enthält, verifiziert werden. Unter Kontrollbedingungen und nach IR nahm die Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit von der p21-3'UTR durch Zugabe von SB203580 ab (Abbildung 17B). Aus den Daten lässt sich daher schließen, dass p38 die p21-Proteinexpression auf translationaler Ebene 3'UTR-

abhängig sowohl basal, als auch nach Bestrahlung aktiviert. Da auch die mRNA-Expression von p21 durch SB203580 verändert wurde, lässt vermuten, dass diese Regulation über die mRNA-Stabilität vermittelt wird.



**Abbildung 17:** Der p38-Inhibitor SB203580 verringert die Expression von p21 in Abhängigkeit der p21-3'UTR.

(A) HCT116 p53<sup>-/-</sup>-Zellen wurden mit den genannten Plasmidkonstrukten transfiziert, die den p21-ORF ± 5'-3'UTR enthalten. 45 min nach Zugabe von SB203580 (20 µM) wurden die Zellen 20 Gy IR ausgesetzt (24 h IR) oder blieben unbehandelt (0 h IR). 24 h nach der Bestrahlung wurden die Zellextrakte gewonnen und mittels Western Blot auf die Expression von FLAG-p21 analysiert. Diese wurde densitometrisch quantifiziert. (B) HCT116 Wildtyp-Zellen wurden mit Luciferase-Konstrukten transfiziert, die neben dem Luciferase-Gen zusätzlich die p21-3'UTR enthalten. Die Zellen wurden mit SB203580 inkubiert, 45 min später bestrahlt (24 h IR) oder blieben unbehandelt (0 h IR). 24 h nach der Bestrahlung wurde die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus vier unabhängig durchgeführten Experimenten.

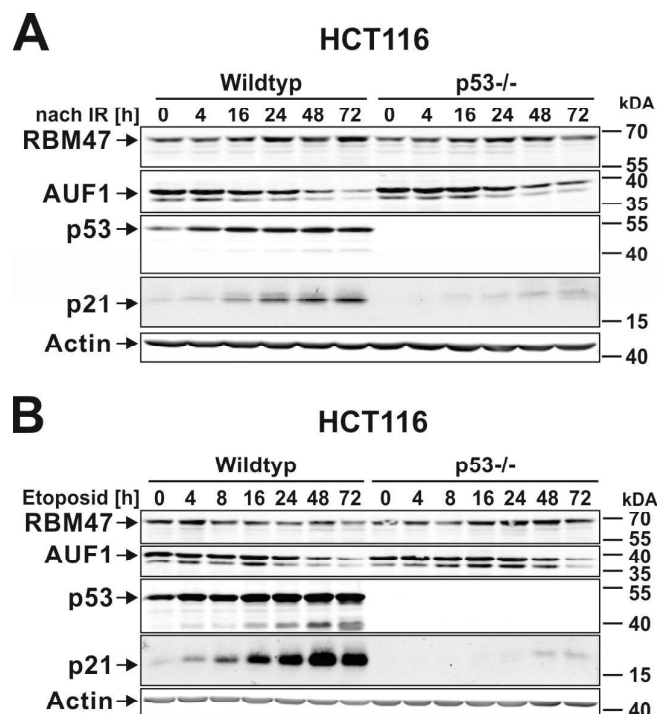
Zusammenfassend ergaben die durchgeführten Analysen, dass die p21-Proteinexpression in HCT116-Zellen nach DNA-Schädigung durch die drei untersuchten MAPK beeinflusst wird. Allerdings unterscheiden sich diese in ihrer Wirkungsweise. Während ERK p21 auf post-translationaler Ebene reguliert, konnte für JNK mit den angewandten Methoden kein eindeutiger Mechanismus nachgewiesen werden. Dagegen kontrolliert p38 die p21-Expression auf translationaler Ebene, da die Expression des FLAG-p21-Konstrukts und die Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit der p21-UTR und des p38-Inhibitors abnahmen. Zusätzlich deutet eine Veränderung der p21 mRNA-Expression auf eine Modifizierung der mRNA-Stabilität hin. Daher könnte dieser Signalweg weiterführend darauf untersucht werden, ob RBPs, und im speziellen RBM47, an der Regulation von p21 in Abhängigkeit von p38 beteiligt sind und ihre Funktionen durch diese MAPK verändert werden. Jedoch wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit diesbezüglich keine weiteren Analysen durchgeführt, da parallele Untersuchungen zur Regulation von p21 durch RBM47 zeigten, dass p21 vor allem indirekt auf transkriptioneller Ebene über p53 von RBM47 kontrolliert wird (Kapitel 3.4.3). Zwar übt RBM47 auch einen translationalen Effekt auf die p21 mRNA-Expression aus (Kapitel 3.4.6), welcher jedoch ebenfalls von p53 abhängig ist und ein direkter MAPK-regulierter Mechanismus daher vermutlich nicht unmittelbar vorliegt.



### 3.4 RBM47 reguliert den p53-p21-Signalweg transkriptionell und translational

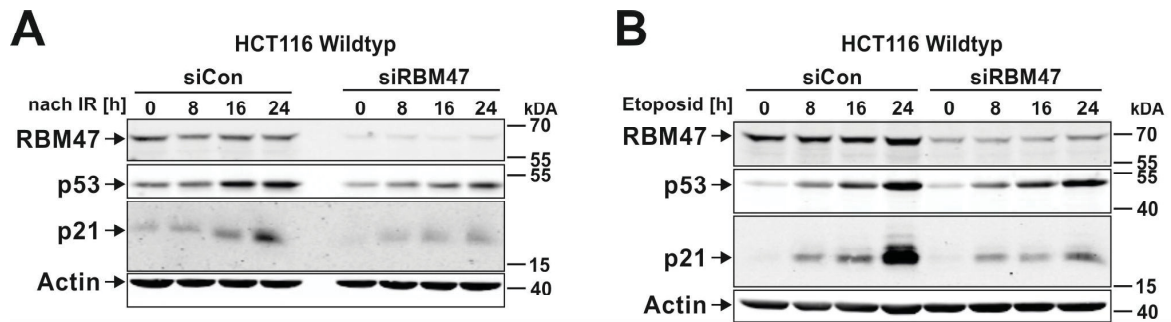
#### 3.4.1 Charakterisierung der RBM47-Expression nach DNA-Schädigung

Um die Rolle von RBM47 in der Induktion von p21 näher zu untersuchen, wurde zunächst die Expression von RBM47 in der DNA-Schädigungsantwort charakterisiert. HCT116 Wildtyp- und p53-defiziente Zellen wurden bestrahlt oder mit dem Topoisomerase II-Hemmer Etoposid behandelt, welcher durch die Stabilisation des Topoisomerase II-DNA-Komplexes DNA-Strangbrüche induziert (Gibson et al., 2016). Wie erwartet, führten beide Stimuli über einen Zeitraum von 72 h zu einer Stabilisierung der Proteinexpression von p53 und zu einer starken Erhöhung von p21 in HCT116 Wildtyp-Zellen. In p53-defizienten Zellen dagegen nahm die p21-Proteinexpression nur sehr schwach zu (Abbildung 18). Im Vergleich dazu verringerte sich die Expression des bekannten p21-mRNA-bindenden Proteins AUF1 in beiden Zelllinien. AUF1 destabilisiert die p21 mRNA (Lal et al., 2004), was mit der beobachteten Zunahme des p21-Proteins korreliert. Im Gegensatz dazu blieb die Expression von RBM47 nach den beiden Stimuli in beiden Zelllinien unverändert. Darüber hinaus konnte auch keine Veränderung der Expression von RBM47 zwischen Wildtyp- und p53<sup>-/-</sup>-Zellen detektiert werden, sodass keine p53-abhängige Regulation der RBM47-Proteinexpression festgestellt werden konnte.



**Abbildung 18:** Die RBM47-Proteinexpression wird nicht durch DNA-Schädigung verändert.

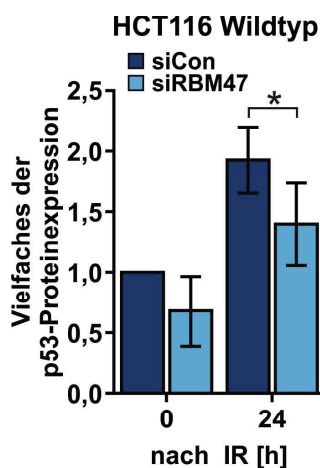
HCT116 Wildtyp- und p53<sup>-/-</sup>-Zellen wurden mit IR (20 Gy) behandelt (A) oder mit Etoposid (50µM) inkubiert (B). Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Zellextrakte durch Western Blot auf die Expression der angegebenen Proteine analysiert. Die dargestellten Western Blots sind repräsentativ für mindestens drei unabhängig durchgeführte Experimente.



**Abbildung 19: Knockdown von RBM47 verringert die p53- und p21-Proteinexpression nach DNA-Schädigung.**

HCT116 Wildtyp-Zellen wurden mit siRNAs gegen RBM47 (siRBM47) oder Kontroll-siRNAs (siCon) transfiziert und 48 h später mit IR behandelt (A) oder Etoposid (50µM) inkubiert (B). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellextrakte gewonnen und auf die Expression von RBM47, p53 und p21 analysiert. Actin diente als Ladekontrolle. Gezeigt sind repräsentative Western Blots aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Da RBM47 die p21 mRNA bindet, sollte untersucht werden, ob RBM47 die Expression von p21 steuert und damit eine Funktion in der p53-p21-DNA-Schädigungsantwort einnimmt. Dazu wurde die p21-Proteinexpression nach siRNA-vermittelter Verringerung von RBM47 und DNA-Schädigung untersucht. Nach der Bestrahlung nahm die p21-Proteinexpression in RBM47-depletierten Zellen zwar ebenfalls zu, jedoch war die Zunahme im Vergleich zu Kontroll-siRNA (siCon)-transfizierten Zellen stark verringert (Abbildung 19A). Der gleiche Effekt trat auch nach Inkubation der Wildtyp-Zellen mit Etoposid auf, die zuvor mit einer siRNA gegen RBM47 (siRBM47) transfiziert wurden (Abbildung 19B). Interessanterweise war neben der p21- auch die p53-Proteinexpression nach Reduktion der RBM47-Expression sowohl nach Bestrahlung, als auch nach Behandlung mit Etoposid supprimiert. Diese Abnahme trat sowohl basal, also nach der Transfektion mit siRBM47 ohne weitere Stimulation, als auch nach DNA-Schädigung durch IR und Etoposid auf. Es wurde zusätzlich eine densitometrische Analyse durchgeführt, um die Veränderung der basalen Expression zu quantifizieren, die den visuellen Eindruck des Western Blots, dass die p53-Proteinexpression durch die Reduktion von RBM47 verringert ist, bestätigen konnte (Abbildung 20).



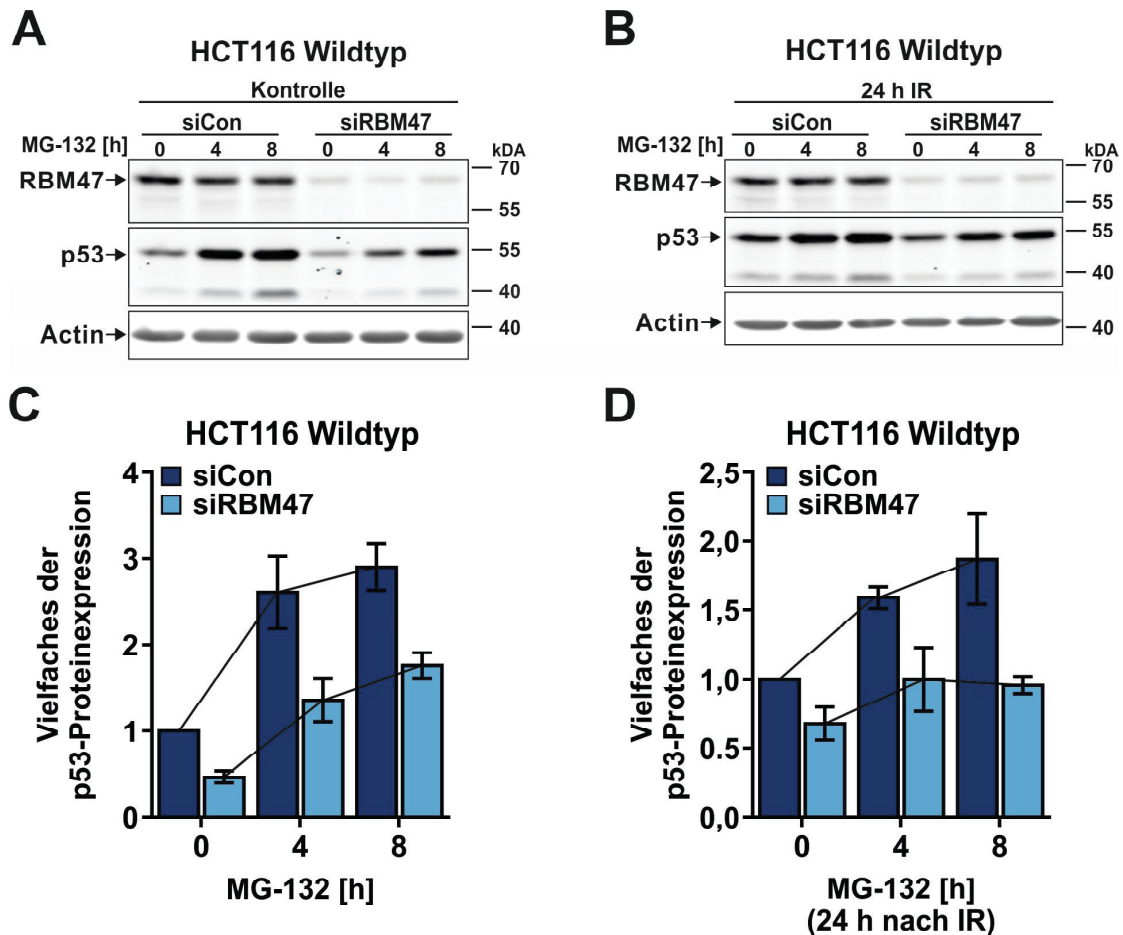
**Abbildung 20: Die p53-Proteinexpression nach dem Knockdown von RBM47 ist basal und nach IR verringert.**

Densitometrische Analyse der p53-Proteinexpression in HCT116 Wildtyp-Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen RBM47. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von den Western Blots in Abbildung 19, 21 und 34 (0h: n=13, 24h: n=6).

Da RBM47 auch die p53-Expression beeinflusst, und nicht wie erwartet nur die p21-Expression, erschwerte dies die Analyse eines direkten Einflusses auf p21. Zur Aufklärung des zur Grunde liegenden Mechanismus muss die Abfolge der Aktivierung von p53 und p21 beachtet werden, da die Reduktion der p21-Expression nach dem *Knockdown* von RBM47 nicht nur wie angenommen auf translationaler Ebene gesteuert sein könnte, sondern auch durch eine verringerte transkriptionelle Aktivität von p53. RBM47 beeinflusst die Proteinexpression von p53 sowohl basal, als auch nach DNA-Schädigung (Abbildung 20). Allerdings ist eine Verbindung von RBM47 und p53 bisher nicht beschrieben. Daher sollte zunächst der Effekt von RBM47 auf die p53-Expression untersucht werden (Kapitel 3.4.2), bevor ein möglicher p53-abhängiger, indirekter (Kapitel 3.4.3) oder p53-unabhängiger direkter Mechanismus (Kapitel 3.4.6) auf die p21-Expression analysiert wurde.

### 3.4.2 RBM47 ist ein positiver Regulator der p53-Promotoraktivität

Die Expression von p53 wird vor allem auf post-translationaler Ebene reguliert, da das p53-Protein nach einem schädigenden Stimulus durch verschiedene Kinasen (ATM, Chk1/2) phosphoryliert wird, was die proteasomale Degradation verhindert und das Protein stabilisiert. In einer Hochdurchsatzstudie konnte gezeigt werden, dass die mRNA der beiden Proteine HDM2 und HDMX, welche die Markierung für den Abbau von p53 vermitteln, von RBM47 gebunden werden (Vanharanta et al., 2014). Daher sollte die Frage geklärt werden, ob RBM47, möglicherweise über diese beiden p53-Regulatoren, die Stabilität des p53-Proteins beeinflusst und dadurch die verringerte p53-Expression nach einem *Knockdown* von RBM47 erklären könnte. Dazu wurden HCT116 Wildtyp-Zellen nach der Verringerung der RBM47-Expression mit siRNA mit dem proteasomalen Inhibitor MG-132 behandelt, der die Degradation von ubiquitinierten Proteinen verhindert (Abbildung 21). Sowohl in den mit Kontroll-siRNA, als auch mit siRNA gegen RBM47-transfizierten Zellen stabilisierte sich wie erwartet die Proteinexpression von p53 nach Stimulation mit MG-132. Allerdings war die p53-Proteinexpression in Zellen, in denen nach siRNA-Transfektion weniger RBM47 exprimiert wurde, im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen insgesamt stark verringert (Abbildung 21A). Interessanterweise zeigten densitometrische Analysen, dass diese Verringerung nicht durch eine verminderte Stabilisierungsrate des p53-Proteins verursacht wurde (Abbildung 21C). Die p53-Proteinexpression nahm auch nach dem *Knockdown* von RBM47 zu, wobei die p53-Proteinmenge jedoch zu jedem Zeitpunkt im Vergleich zu den Kontroll-Zellen reduziert war. Auch nach zusätzlicher Bestrahlung (neben der Behandlung mit MG-132) blieb die p53-Proteinexpression nach der Reduktion von RBM47 verringert (Abbildung 21B), zeigte aber ebenfalls keine veränderte Stabilisierungsrate (Abbildung 21D). Daraus lässt sich schließen, dass RBM47 die Regulation von p53 nicht auf post-translationaler



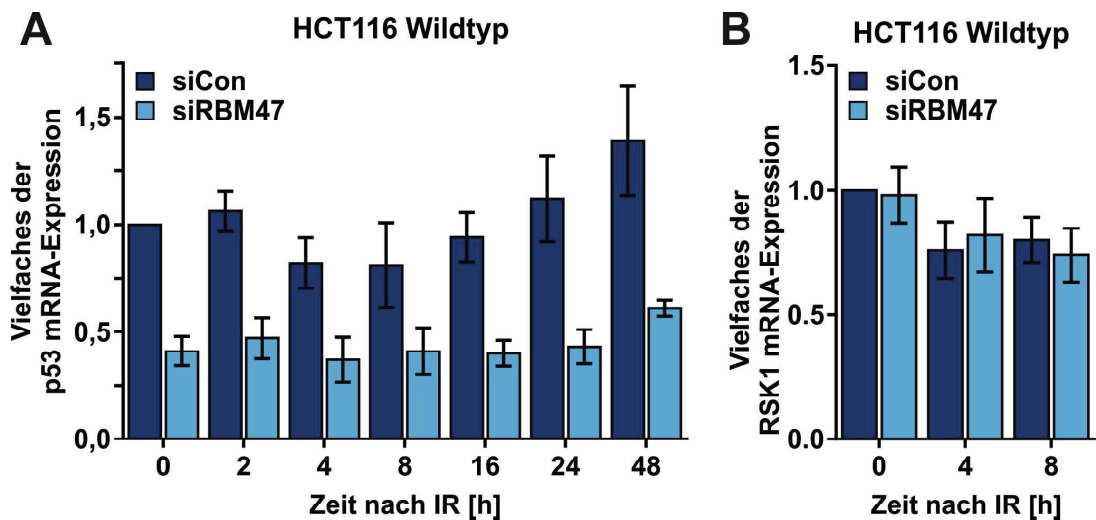
**Abbildung 21: RBM47 beeinflusst die Stabilität von p53 nicht.**

HCT116 Wildtyp-Zellen wurden mit RBM47-siRNA (siRBM47) oder Kontroll-siRNA (siCon) transfiziert und 48 h später mit MG-132 (A, C) oder mit IR und MG-132 (24 h nach der Bestrahlung) (B, D) behandelt. (A, B) Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellextrakte gewonnen und diese mittels Western Blot für Proteine RBM47 und p53 analysiert. Actin diente als Ladekontrolle. Gezeigt sind repräsentative Western Blots aus drei unabhängigen Experimenten (C, D). Die Proteinexpression von p53 aus den Western Blots aus A bzw. C wurden densitometrisch quantifiziert. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Ebene beeinflusst. Wäre die Ursache der Verringerung der p53-Proteinexpression nach *Knockdown* von RBM47 ein verstärkter proteasomaler Abbau, sollten in RBM47-depletierten Zellen und in Kontrollzellen vergleichbare p53-Proteinmengen vorliegen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Veränderung der p53-Expression durch RBM47 vermutlich auf transkriptioneller oder translationaler Ebene reguliert wird.

Zur weiteren Eingrenzung des Einflusses von RBM47 auf die p53-Expression wurde die p53 mRNA-Expression nach dem *Knockdown* von RBM47 untersucht. Die Menge der mRNA-Expression wird sowohl durch die Transkriptionsrate bestimmt, also auch durch post-transkriptionelle bzw. translationale Effekte (z.B. mRNA-Stabilität). Bei einem Mechanismus, der die Translationsrate betrifft, wäre die mRNA-Expression nicht durch RBM47 verändert. Durch Transfektion mit siRNA gegen RBM47 verringerte sich die p53 mRNA-Expression in HCT116 Wildtyp-Zellen sowohl basal, als auch über einen Zeitraum von 72 h nach Bestrahlung um ca. 50% (Abbildung 22A). Im Gegensatz dazu

blieb die mRNA-Expression der p90-ribosomaler S6 Kinase (RSK1) selbst in bestrahlten Zellen nach Reduktion der RBM47-Expression unverändert (Abbildung 22B). Das weist darauf hin, dass RBM47 spezifisch die mRNA-Expression von p53 reguliert und es sich nicht um eine ubiquitäre Wirkung nach der Verringerung des RBM47-Proteins handelt, welche die Expression vieler mRNAs betrifft. Folglich ist die Reduktion der p53 mRNA-Expression in RBM47-Knockdown-Zellen die Ursache für die Abnahme der p53-Proteinexpression (Abbildung 19).

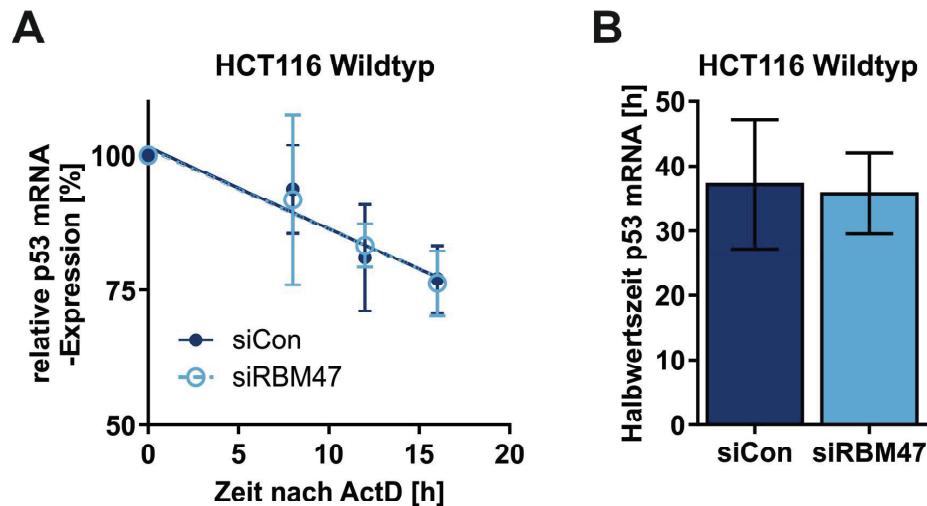


**Abbildung 22:** Die p53 mRNA-Expression ist durch den *Knockdown* von RBM47 verringert.

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung wurde RNA aus HCT116 Wildtyp-Zellen, die 48 h zuvor mit siRNA gegen RBM47 (siRBM47) oder Kontroll-siRNA (siCon) transfiziert wurden, isoliert. Mittels qPCR wurden die mRNA-Expression von p53 (**A**) und p90-ribosomaler S6 Kinase (RSK1; **B**) analysiert. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Die Verringerung der p53 mRNA-Expression nach der RBM47-siRNA-Transfektion könnte sich durch zwei Mechanismen erklären lassen. Entweder verringert die Reduktion von RBM47 die Stabilität der p53 mRNA, was zu einer Abnahme der p53 mRNA-Expression führt, oder die Transkription der p53 mRNA selbst wird durch RBM47 beeinflusst. Um zunächst die erste genannte Annahme zu überprüfen, wurde ein mRNA-Stabilitätsassay durchgeführt (Abbildung 23). Nach der Transfektion mit einer Kontroll-siRNA oder der RBM47-siRNA wurden HCT116 Wildtyp-Zellen zur Aktivierung der DNA-Schädigungsantwort mit 20 Gy bestrahlt. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem Transkriptioninhibitor Actinomycin D (ActD) behandelt. Durch Blockierung der RNA-Synthese und anschließender Bestimmung der verbliebenen mRNA-Menge zu verschiedenen Zeitpunkten kann der Abbau gemessen und damit die Stabilität bzw. Halbwertszeit der mRNA bestimmt werden. In Zellen mit verringerter RBM47-Expression veränderte sich die Stabilität (Abbildung 23A) und die daraus resultierende Halbwertszeit (Abbildung 23B) der p53 mRNA im Vergleich zu den Kontrollzellen allerdings nicht.

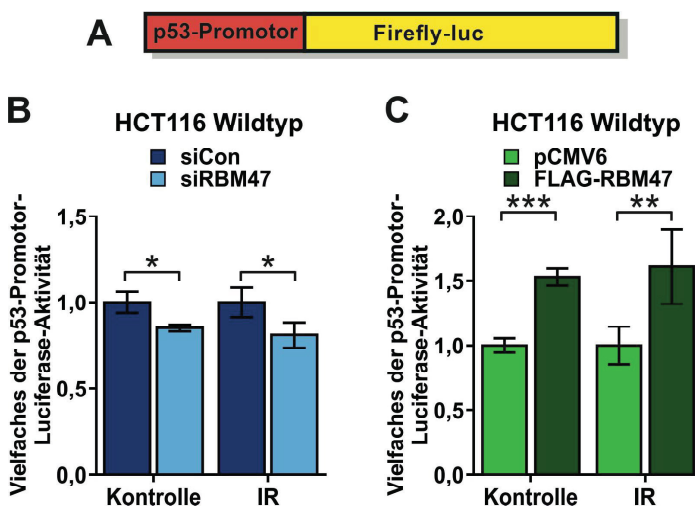




**Abbildung 23:** Die p53 mRNA-Stabilität wird durch den *Knockdown* von RBM47 nicht verändert.

HCT116 Wildtyp-Zellen wurden mit siRNA gegen RBM47 (siRBM47) oder Kontroll-siRNA (siCon) transfiziert nach 48 h mit 20 Gy bestrahlt. Zwei Stunden nach IR wurden die Zellen mit dem Transkriptioninhibitor Actinomycin D (ActD) inkubiert. Das relative p53 mRNA-Expressionslevel wurde im Vergleich zu einer unbehandelten Probe zu den angegebenen Zeitpunkten mittels qPCR ermittelt (A). Aus den berechneten Regressionsgeraden wurde die Halbwertszeit der p53 mRNA bestimmt (B). Die dargestellten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Das weist darauf hin, dass die p53 mRNA-Expression durch RBM47 nicht auf der Ebene der mRNA-Stabilität kontrolliert wird, sondern dass ein *Knockdown* von RBM47 eine Reduktion der p53 mRNA-Transkriptionsrate bewirkt. Zur Klärung dieser Frage wurde die p53-Promotoraktivität in Abhängigkeit von RBM47 mit einem Luciferase-Reportersystem analysiert, in dem die Expression des Luciferase-Gens unter der Kontrolle eines 356 bp-großen Fragments des p53-Promotors steht (pGL4.10-p53-Prom-356bp) (Abbildung 24A). In der Tat wurde die Luciferase-Aktivität in unbehandelten und bestrahlten HCT116 Wildtyp-Zellen nach Reduktion der RBM47-Expression leicht, aber signifikant verringert (Abbildung 24B). Übereinstimmend mit diesem Ergebnis wurde die Luciferase-Aktivität durch Überexpression eines FLAG-RBM47-Konstrukts in unbehandelten und bestrahlten Zellen signifikant erhöht (Abbildung 24C).



**Abbildung 24:** RBM47 erhöht die p53-Promotoraktivität.

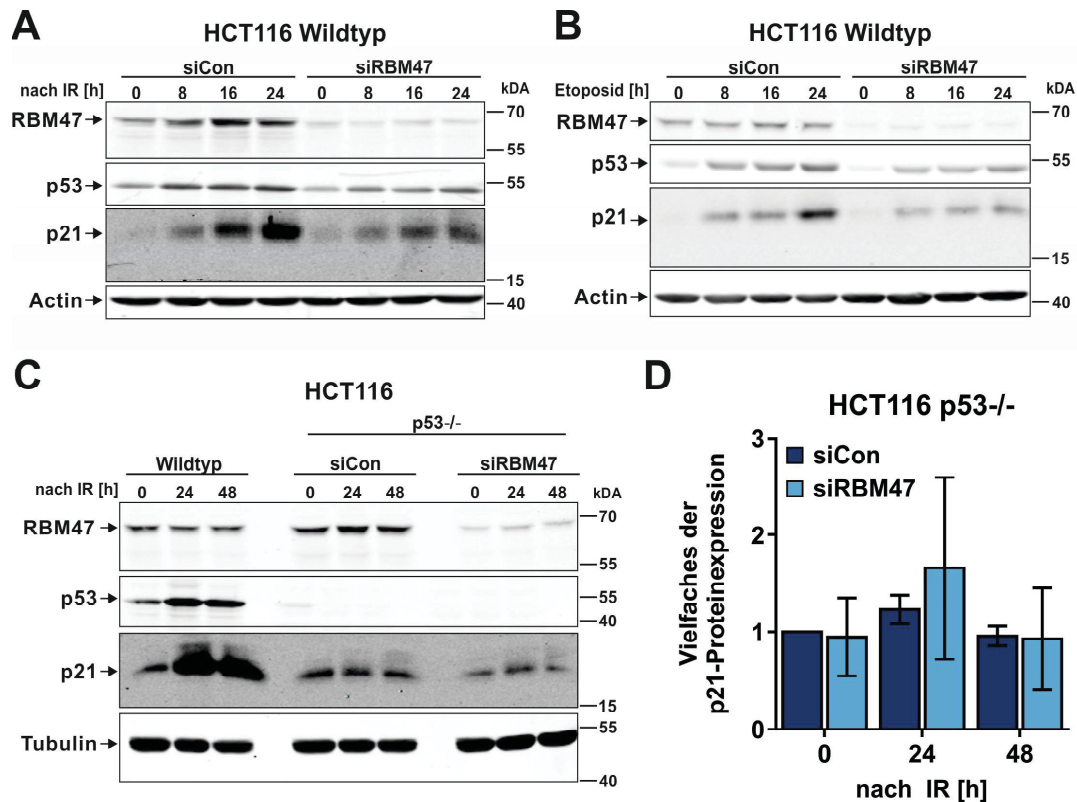
250 ng eines Luciferase-Konstrukts, welches ein p53-Promotor-Fragment (356bp) enthält (A), wurde in HCT116 Wildtyp-Zellen zusammen mit siRNA gegen RBM47 (B) oder einem FLAG-RBM47-Konstrukt (C) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit 20 Gy bestrahlt (IR) oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Nach 24 h wurde die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten.



Demzufolge übt die Anwesenheit von RBM47 einen positiven Einfluss auf das p53-Promotor-Fragment aus, was den Schluss zulässt, dass RBM47 die p53-Expression in Abhängigkeit vom p53-Promotor, also auf transkriptioneller Ebene, positiv reguliert. Da dies sowohl basal, als auch nach Stimulation mit IR zu beobachten war, ist diese Regulation unabhängig von einem DNA-schädigenden Stimulus. Diese Wirkung von RBM47 auf die p53-Promotoraktivität erklärt die verringerte p53 mRNA-Expression nach dem RBM47-*Knockdown* (Abbildung 22). Allererdings aktiviert p53 nach DNA-Schädigung seine Zielgene transkriptionell, weswegen anzunehmen ist, dass auf Grund der verringerten p53-Expression in Abwesenheit von RBM47 auch die Expression der p53-Ziele gene betroffen ist (Kapitel 3.4.3).

### **3.4.3 RBM47 erhöht die IR-induzierte p21-Promotor-Aktivität in Abhängigkeit von p53**

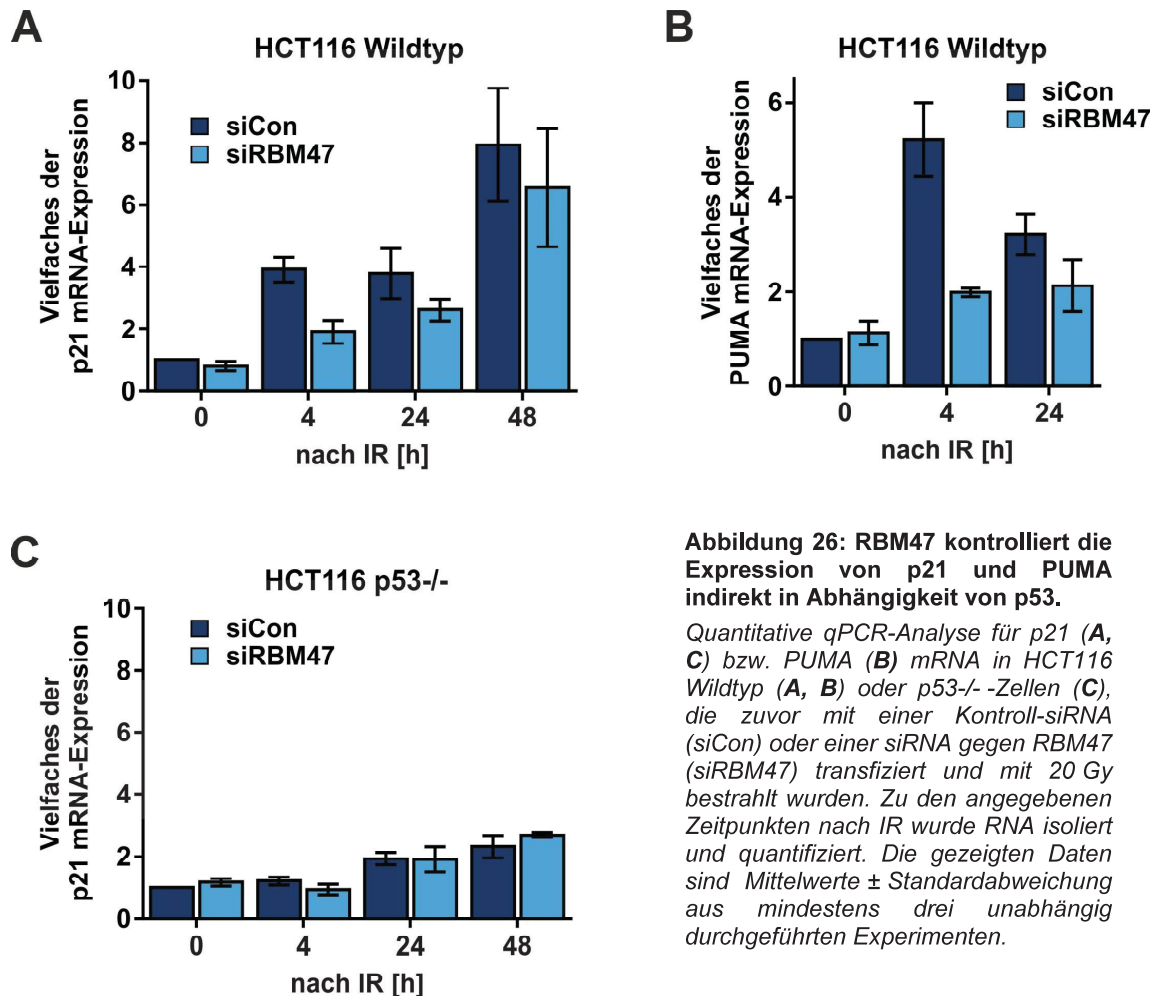
Nach einem DNA-schädigenden Stimulus aktiviert p53 zahlreiche Zielgene. Daher stellte sich die Frage, welchen indirekten Effekt RBM47 über die Regulation von p53 auf diese Zielgene hat. Da die Protein-Induktion von p21 nach DNA-Schädigung (IR, Etoposid) in Abwesenheit von RBM47 reduziert war (Abbildung 25A, B; und Kapitel 3.4.1), sollte der p53-abhängige Effekt von RBM47 auf die p21-Transkription analysiert werden. Dazu wurden neben HCT116 Wildtyp auch p53-defizienten HCT116- Zellen eingesetzt. Tatsächlich war im Vergleich zu den Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen die Verringerung der p21-Proteinexpression nach der Transfektion mit RBM47-siRNA in p53-defizienten Zellen nicht zu beobachten (Abbildung 25C). Eine densitometrische Quantifizierung der p21-Expression verifiziert den visuellen Eindruck aus den Western Blots (Abbildung 25D). Dies unterstützt die Vermutung, dass in HCT116 Wildtyp-Zellen die verminderte p53-Expression ursächlich für die Verringerung von p21 nach Reduktion von RBM47 ist. . Daher sollte diese Hypothese, dass RBM47 die p21-Expression nach DNA-Schädigung hauptsächlich indirekt in Abhängigkeit von p53 reguliert, weiter untersucht werden. Dazu wurde die Expression der p21 mRNA nach Transfektion mit siRBM47 analysiert. Diese nahm in bestrahlten HCT116 Wildtyp-Zellen nach dem *Knockdown* von RBM47 im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen ab (Abbildung 26A), sodass die Verringerung der p21-Proteinexpression auf diese Reduktion zurück zu führen ist (Abbildung 19). Übereinstimmend damit war auch die Expression von PUMA, einem weiteren p53-Zielgen, nach Transfektion mit RBM47-siRNA und Bestrahlung reduziert (Abbildung 26B).



**Abbildung 25:** Nach DNA-Schädigung ist die p21-Expression nur in HCT116 Wildtyp-, aber nicht in p53-defizienten Zellen verringert.

Die HCT116 Wildtyp (A, B) und p53<sup>-/-</sup>-Zellen (C) wurden zunächst mit siRNA gegen RBM47 transfiziert und 48 h später IR behandelt (A, C) oder Etoposid (50µM) inkubiert (B). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellextrakte gewonnen und mittels Western Blot auf die Expression von RBM47, p53 und p21 analysiert. Actin (A, B) bzw. Tubulin (C) dienten als Ladekontrolle. Die Expression von p21 in HCT116 p53<sup>-/-</sup>-aus C wurde densitometrisch quantifiziert (D). Um die Expression von p21 in HCT116 p53<sup>-/-</sup>-Zellen in C zu detektieren, mussten die Aufnahmen in hoher Intensität gemacht werden, sodass die Banden für p21 in den Wildtyp-Zellen überbelichtet wurden. Die gezeigten Western Blots sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente (A, B, C). Bei A und B handelt es sich um Replikate aus Abbildung 19. Die dargestellten Daten in D sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

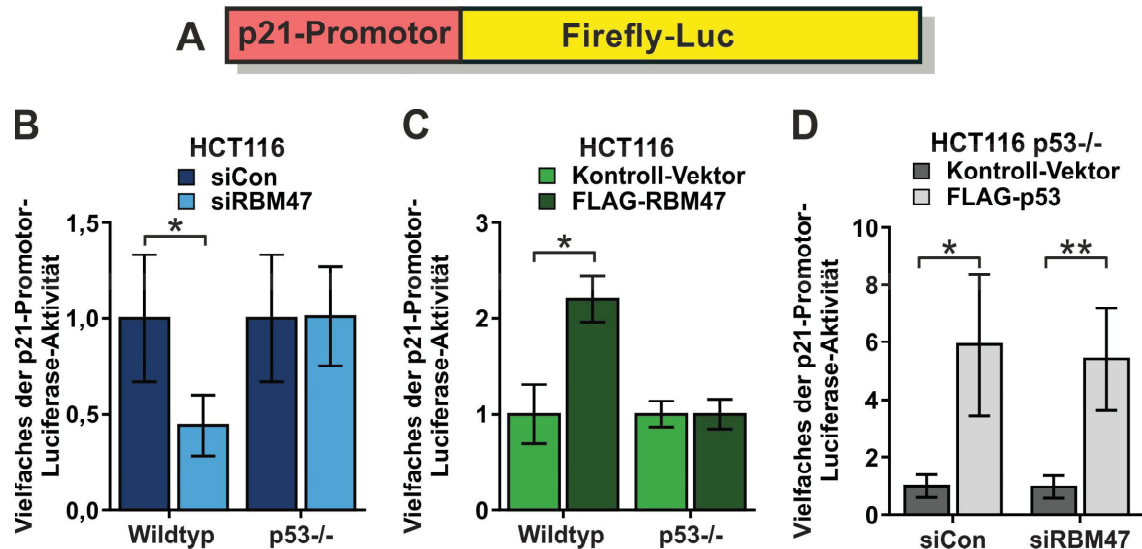
Im Gegensatz dazu war in HCT116 p53<sup>-/-</sup>-Zellen die p21 mRNA-Expression durch die Transfektion mit siRNA gegen RBM47 nicht verringert (Abbildung 26C), was in Übereinstimmung mit den Daten der Proteinexpression von p21 in p53-defizienten Zellen ist (Abbildung 25C, D). Dass diese Abnahme der mRNA-Expression spezifisch Zielgene von p53 betrifft, wird auch von dem Ergebnis unterstützt, dass andere Gene (wie z.B. RSK1) hiervon nicht betroffen waren (Abbildung 22B). Zusammengefasst weisen die bisherigen Ergebnisse stark daraufhin, dass RBM47 die p21-Expression in Abhängigkeit von p53 auf transkriptioneller Ebene steuert. Eine geringere p53-Expression nach dem *Knockdown* von RBM47 führt zu einer verminderten p21-Expression auf mRNA- und Proteinebene. Bei einer p53-unabhängigen p21-Induktion, wie z.B. in den HCT116 p53<sup>-/-</sup>-Zellen, wird die Expression durch RBM47 allerdings nicht verändert.



**Abbildung 26: RBM47 kontrolliert die Expression von p21 und PUMA indirekt in Abhängigkeit von p53.**

Quantitative qPCR-Analyse für p21 (A, C) bzw. PUMA (B) mRNA in HCT116 Wildtyp (A, B) oder p53<sup>-/-</sup>-Zellen (C), die zuvor mit einer Kontroll-siRNA (siCon) oder einer siRNA gegen RBM47 (siRBM47) transfiziert und mit 20 Gy bestrahlt wurden. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach IR wurde RNA isoliert und quantifiziert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde analog zur Untersuchung der p53-Promotoraktivität ein Luciferase-Konstrukt verwendet, in dem das Luciferase-Gen unter der Kontrolle eines 4,3 kb-großen p21-Promotorfragements (pGL4.10-p21-Prom-4,3kb) steht (Abbildung 27A). Die Aktivität dieses so kontrollierten Luciferase-Gens wurde in HCT116 Wildtyp-Zellen nach der Transfektion mit siRBM47 stark verringert (Abbildung 27B), wogegen die Überexpression von FLAG-RBM47 zu einer bedeutenden Erhöhung führte (Abbildung 27C). In p53-defizienten Zellen dagegen übte in Übereinstimmung mit den Beobachtungen der p21-Protein- und mRNA-Expression weder der *Knockdown* (Abbildung 27B), noch die Überexpression (Abbildung 27C) von RBM47 einen Einfluss auf die p21-Promotor-kontrollierte Luciferase-Aktivität aus. Die Überexpression von FLAG-p53, welches konstitutiv unter Einfluss eines CMV-Promotors exprimiert wurde, induzierte wie erwartet die Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit vom p21-Promotor in p53-defizienten Zellen (Abbildung 27D). Die Transfektion mit siRNAs gegen RBM47 veränderte die Expression der Luciferase im Vergleich zur Transfektion mit Kontroll-siRNAs dagegen in Abhängigkeit von p53 nicht. Denn die Überexpression von p53 steht nicht unter der Kontrolle des nativen Promotors, sodass eine Reduktion der RBM47-Expression keinen Einfluss auf die p53-Expression besitzt. Folglich verändert sich auch



**Abbildung 27: RBM47 erhöht die IR-induzierte p21-Promotor-Aktivität in Abhängigkeit von p53.**

Die Aktivität eines Luciferase-Konstrukts, welches ein 4,3 kb-großes Fragment des p21-Promotor enthält (A), wurde in HCT116 Wildtyp (B, C) und p53-/- (B, C, D)-Zellen bestimmt. Die Zellen wurden mit siRNA (B, D) oder Expressionsplasmiden (C, D) transfiziert. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

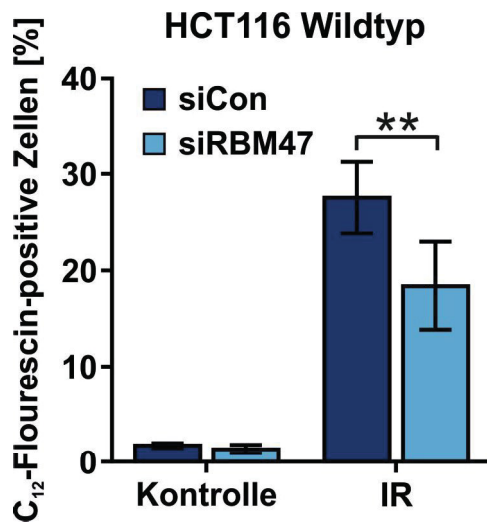
die p21-Promotoraktivität nicht. Dies zeigt, dass die p21-Promotoraktivität allein von p53 und damit nur indirekt von RBM47 abhängig ist.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass RBM47 die Expression von p21 indirekt über p53 reguliert, wobei RBM47 einen stimulierenden Effekt auf die p53-Promotoraktivität ausübt. Fehlt RBM47, wird weniger p53 mRNA transkribiert und folglich wird auch weniger p53-Protein produziert. Dies resultiert in einer geringeren transkriptionellen Aktivierung der p53-Zielgene, wie z.B. p21 und PUMA. Da p53 über seine Zielgene Entscheidungen über das Zellschicksal vermittelt, ist zu anzunehmen, dass die p53-Regulation durch RBM47 einen Einfluss auf diesen Vorgang hat (Kapitel 3.4.4). Da RBM47 die p21 mRNA jedoch auch direkt bindet, darf ein möglicher Effekt, der durch diese Bindung entsteht, nicht außer Acht gelassen werden (s. Kapitel 3.4.6).

### 3.4.4 RBM47 wird für die IR-induzierte Seneszenz benötigt

Der p53-p21-Signalweg spielt eine große Rolle bei der Bestimmung des Zellschicksals nach DNA-Schädigung. Da RBM47 die Expression von p53 und p21, welches für den Eintritt in die Seneszenz verantwortlich ist, reguliert, stellt sich die Frage nach der biologischen Funktion von RBM47 in Zusammenhang mit dem Zellschicksal. HCT116 Wildtyp-Zellen leiten nach Bestrahlung Seneszenz ein (Kapitel 3.1), wohingegen p53-defiziente Zellen auf Grund der fehlenden p21-Induktion stattdessen in den Zelltod gehen, da ein permanenter Zellzyklusarrest unter diesen Bedingungen weder eingeleitet noch aufrechterhalten werden kann (Sohn et al., 2006). Daher sollte mit verschiedenen Methoden das Zellschicksal in Abhängigkeit von RBM47 untersucht werden. Während der Seneszenz kommt es zur Expression der SA- $\beta$ -Gal, deren Aktivität nachgewiesen werden

kann. Dazu wurde das Substrat C<sub>12</sub>-FDG eingesetzt, welches in der Zelle durch die SA- $\beta$ -Gal gespalten werden kann. Zellen, die positiv für das C<sub>12</sub>-gekoppelte Spaltprodukt Fluorescein sind, können durchflusszytometrisch detektiert und als Maß für die Seneszenz quantifiziert werden. Während die Zahl seneszenten Zellen in unbestrahlten Wildtyp-Zellen und RBM47-Knockdown-Zellen sehr gering war, nahm sie durch die Bestrahlung stark zu. Im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten Zellen verringerte die Reduktion der RBM47-Expression allerdings die Zahl seneszenten Zellen nach Bestrahlung (Abbildung 28).

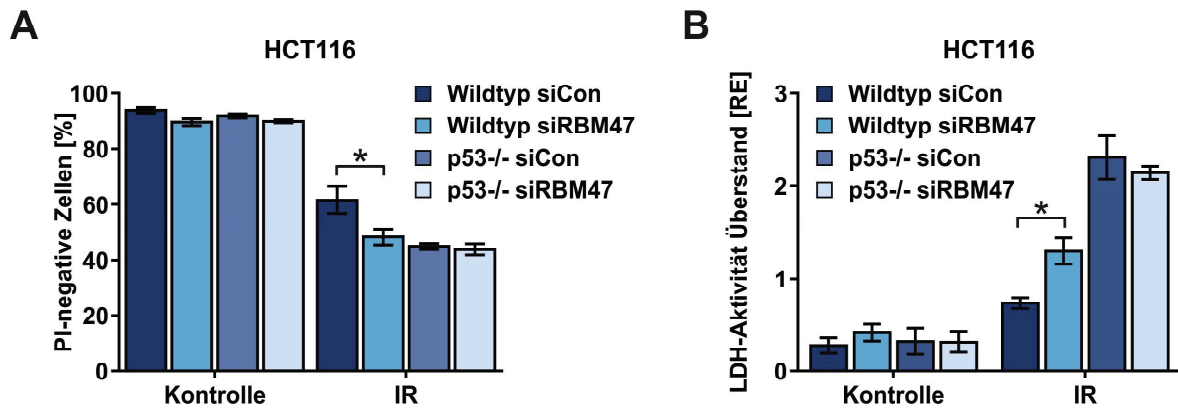


**Abbildung 28: Die Transfektion mit siRBM47 verringert die Zahl seneszenten Zellen.**

*HCT116-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit Kontroll-siRNA (siCon) oder einer siRNA gegen RBM47 (siRBM47) mit 20 Gy bestrahlt. Nach 72 h erfolgte die durchflusszytometrische Messung der SA- $\beta$ -Gal-Aktivität. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus vier unabhängig durchgeführten Experimenten.*

In Übereinstimmung hiermit konnte anhand zwei verschiedener Testsysteme nachgewiesen werden, dass der Zelltod nach RBM47-Depletion zunahm (Radine et al., 2019; Abbildung 29). So wurde zum einen die Zahl lebender, PI-negativer Zellen durch den Ausschluss des DNA-interkalierenden Farbstoffes Propidium-Iodid (PI) bestimmt. Zwar leiten Wildtyp-Zellen nach IR hauptsächlich Seneszenz ein, allerdings sterben einige der Zellen auch durch diese hohe Dosis IR. Wurden die Zellen zusätzlich zur Bestrahlung zuvor mit siRNA gegen RBM47 transfiziert, verringerte sich die Zahl PI-negativer Zellen weiter (Radine et al., 2019; Abbildung 29A). Um zu überprüfen, ob die Veränderung des Zellschicksals von der Seneszenz zur Apoptose nach Reduktion von RBM47 auf die modifizierte p53-Expression zurückzuführen ist, wurde das Zellschicksal auch in p53-defizienten Zellen untersucht. Wie erwartet, nahm die Zahl PI-negativer Kontroll-siRNA-transfizierter p53<sup>-/-</sup>-Zellen durch Bestrahlung deutlich und in einem stärkeren Maße als in den Wildtyp-Zellen ab, da ohne p53 nach einem DNA-schädigenden Stimulus Apoptose eingeleitet wird. Allerdings änderte sich die Anzahl PI-negativer p53<sup>-/-</sup>-Zellen durch die Transfektion mit siRBM47 nicht im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten p53<sup>-/-</sup>-Zellen (Abbildung 29A), was erneut die p53-Abhängigkeit der Regulation von RBM47 demonstriert.





**Abbildung 29:** Die Transfektion mit siRBM47 verändert die PI-Aufnahme und die LDH-Aktivität nach IR in HCT116 Wildtyp-Zellen, aber nicht in p53-defizienten Zellen.

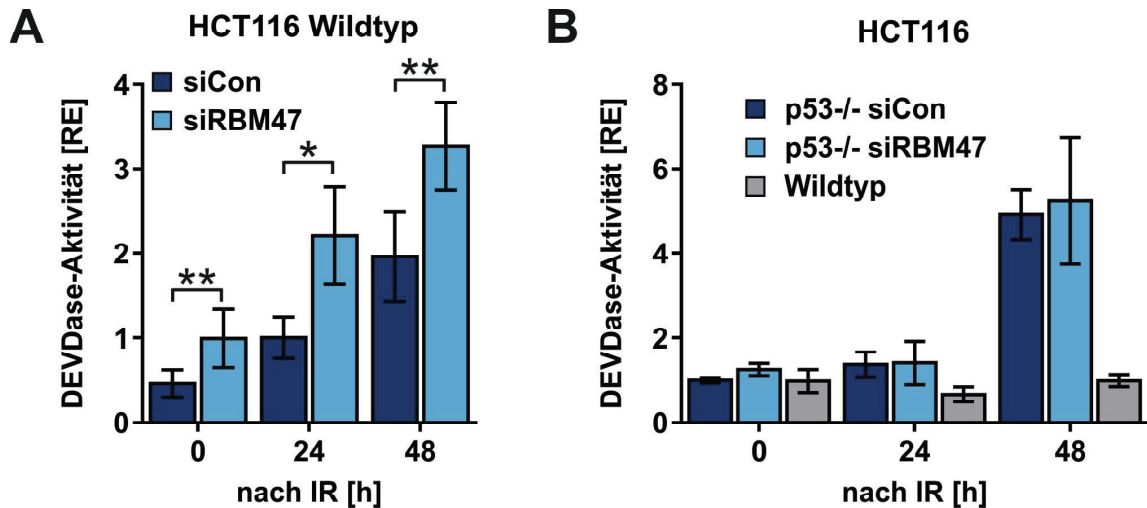
HCT116-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit Kontroll-siRNA (siCon) oder einer RBM47-siRNA (siRBM47) mit 20 Gy bestrahlt. (A) Nach 72h erfolgte die durchflusszytometrische Messung der PI-Aufnahme. (B) Fünf Tage nach der Bestrahlung der Zellen wurde die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase (LDH) im Zellüberstand bestimmt. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten (modifiziert nach Radine et al., 2019)

Im Zellkulturüberstand von HCT116 Wildtyp-Zellen erhöhte sich durch IR analog zur Aufnahme von PI auch die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase (LDH), die eigentlich intrazellulär zu finden ist und nur aus toten Zellen freigesetzt wird (Radine et al., 2019; Abbildung 29B). Durch den *Knockdown* von RBM47 mittels siRNAs stieg die Aktivität der LDH im Überstand nach Bestrahlung im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten Wildtyp-Zellen sogar noch weiter an. In Übereinstimmung mit den PI-Daten nahm auch die LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand der p53-defizienten Zellen nicht nur durch Bestrahlung zu, sondern war auch deutlich höher als die im Überstand der Wildtyp-Zellen. Allerdings änderte sich die Aktivität durch die Reduktion der RBM47-Expression nicht (Abbildung 29B). Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass durch die Verringerung der RBM47-Expression und die damit verringerte p21-Expression die Einleitung der Seneszenz in Wildtyp-Zellen nach einer DNA-Schädigung durch IR beeinträchtigt ist, und es stattdessen verstärkt zum Zelltod kommt. In p53-defizienten Zellen dagegen hat RBM47 keinen Einfluss auf das Zellschicksal nach IR.

Um herauszufinden, ob Apoptose die Ursache für die Zunahme des Zelltods nach Reduktion der RBM47-Expression ist, wurde die DEVDase-Aktivität in HCT116 Wildtyp-Zellen untersucht (Radine et al., 2019; Abbildung 30A). Diese ist ein Maß für die Aktivität der Caspase-3, welche während der Apoptose aktiviert wird und hauptsächlich für die Durchführung des apoptotischen Zellprogramms verantwortlich ist. Durch Bestrahlung wurde die DEVDase-Aktivität in Wildtyp-Zellen leicht erhöht, da einige Zellen nach IR Apoptose einleiten. Nach der Transfektion der Zellen mit siRNA gegen RBM47 stieg die DEVDase-Aktivität unter Kontroll-(0 h) und Stressbedingungen (IR, 24 h und 48 h) im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten Zellen sogar noch weiter an. Zusammen weisen diese Daten darauf hin, dass der durch die PI-Aufnahme und LDH-Aktivität gezeigte



Anstieg des Zelltods nach Verringerung der RBM47-Expression, sehr wahrscheinlich durch Apoptose verursacht wurde. In p53-defizienten Zellen nahm die DEVDase-Aktivität nach 48 h nach IR wie erwartet und in einem höheren Maße als in Wildtyp-Zellen nach Bestrahlung zu (Abbildung 30B). Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Wildtyp-Zellen wurde diese Zelltodrate durch RBM47-*Knockdown* aber nicht noch weiter erhöht.



**Abbildung 30: Der *Knockdown* von RBM47 verändert die DEVDase-Aktivität nur in HCT116 Wildtyp-Zellen, nicht in p53-defizienten Zellen.**

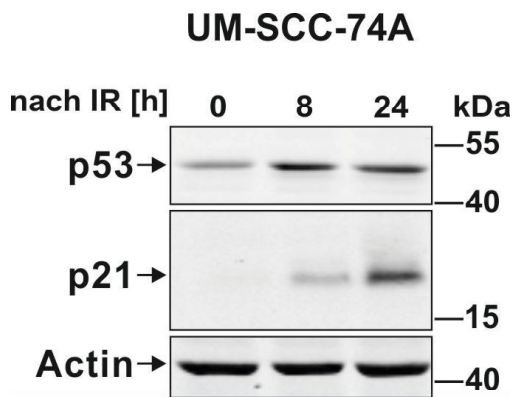
HCT116-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit Kontroll-siRNA (siCon) oder einer siRNA gegen RBM47 (siRBM47) mit 20 Gy bestrahlt. Die Caspase-3-Aktivität wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach IR mit dem Substrat Ac-DEVD-AMC in HCT116 Wildtyp- (A) und p53-/- -Zellen (B) analysiert. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. RE=relative Einheiten. A modifiziert nach Radine et al., 2019.

Aus den Beobachtungen der Wildtyp- und p53-defizienten Zellen lässt sich schlussfolgern, dass die Veränderung des Zellschicksals nach dem *Knockdown* von RBM47 auf die veränderte Expression von p53 und p21 zurück zu führen ist. Ist p53 in der Zelle vorhanden, wird Seneszenz eingeleitet. Verringert der RBM47-*Knockdown* die p53-Expression, nimmt auch die Zahl seneszenten Zellen ab, aber dafür nimmt die Apoptose zu. Da der Anstieg der Apoptose in p53-defizienten Zellen nicht festgestellt werden konnte, wird dieser Effekt von RBM47 in Abhängigkeit von p53 vermittelt. Dies bedeutet, dass RBM47 für die Ausprägung der Seneszenz benötigt wird.

### 3.4.5 RBM47 wird auch in weiteren Tumorentitäten für die p53-Expression benötigt

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Regulation der p53- und p21-Expression und damit auch des Zellschicksals durch RBM47 um einen allgemeinen Mechanismus handelt, wurde dies auch in zwei weiteren Zelllinien aus unterschiedlichen Tumorentitäten untersucht. Die aus dem Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereichs (HNSCC: *head and neck squamous cell carcinoma*) stammende Zelllinie UM-SCC-74A besitzt wie die HCT116-Wildtyp-Zellen ein p53-Wildtyp-Gen (Bradford et al., 2003) und weist eine deutliche Stabilisierung der p53- und p21-Expression nach DNA-Schädigung auf

(Abbildung 31). Außerdem wurde die Brustkrebszelllinie MCF-7 verwendet, in der nach DNA-Schädigung ebenfalls die Expression von p53 und p21 erhöht ist und Seneszenz eingeleitet wird (Essmann et al., 2004; Jones et al., 2005).



**Abbildung 31: Die Expression von p53 und p21 nimmt nach IR in UM-SCC-74A zu.**

*Nach der Behandlung mit IR wurde zu den angegebenen Zeitpunkten Zellextrakte der UM-SCC-74A-Zellen gewonnen und auf die Expression von p53 und p21 analysiert. Actin diente als Ladekontrolle. Die gezeigten Western Blots sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.*

In Übereinstimmungen mit den vorherigen Daten aus den HCT116-Zellen (Abbildung 22A) führte die Reduktion von RBM47 in beiden Zelllinien basal und nach DNA-Schädigung zu einer Abnahme der p53 mRNA-Expression (Abbildung 32A, B). Ebenso verringerte sich durch den *Knockdown* von RBM47 die bestrahlungsinduzierte mRNA-Expression der p53-Zielgene p21 und PUMA im Vergleich zu den Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen (Abbildung 32C-F). Auf Grund der supprimierten mRNA-Expression war auch die Proteinexpression von p53 und p21 in den UM-SCC-74A-Zellen reduziert (Abbildung 33A). Während die Proteinexpression von p21 auch in MCF-7-Zellen entsprechend der mRNA-Daten nach der Transfektion mit siRBM47 abnahm, war die p53-Proteinmenge nicht reduziert, sondern im Gegenteil sogar erhöht (Abbildung 33B). Dies steht außerdem im Gegensatz zur verringerten Expression der p53-Zielgene, da eine erhöhte p53-Proteinexpression eine Zunahme der Zielgenexpression erwarten lässt. Auf Grund dieser Diskrepanzen war die Untersuchung des Zellschicksals von besonderem Interesse. In beiden Zelllinien kam es durch die Reduktion von RBM47 zu einer Verschiebung von Seneszenz zur Apoptose. Nach der Transfektion mit siRBM47 nahm sowohl in UM-SCC-74A-, als auch in MCF-7-Zellen die Zahl SA- $\beta$ -Gal-positiver Zellen (Abbildung 34A, B) nach Bestrahlung ab. Analog dazu verringerte sich die Zahl PI-negativer (lebender) Zellen (Abbildung 34C, D), was eine Zunahme des Zelltods bedeutet. Damit stimmen in beiden Zelllinien die Veränderung der Expression von p53, p21 und des Zellschicksals durch den RBM47-*Knockdown* -mit Ausnahme der p53-Proteinexpression in MCF-7- mit den Beobachtungen aus den HCT116-Zellen überein. Folglich handelt es sich bei der Regulation des p53-p21-Signalwegs und der Seneszenz durch RBM47 um einen generellen Zellschicksal-beeinflussenden Mechanismus, der nicht auf eine einzige Tumorentität beschränkt ist.

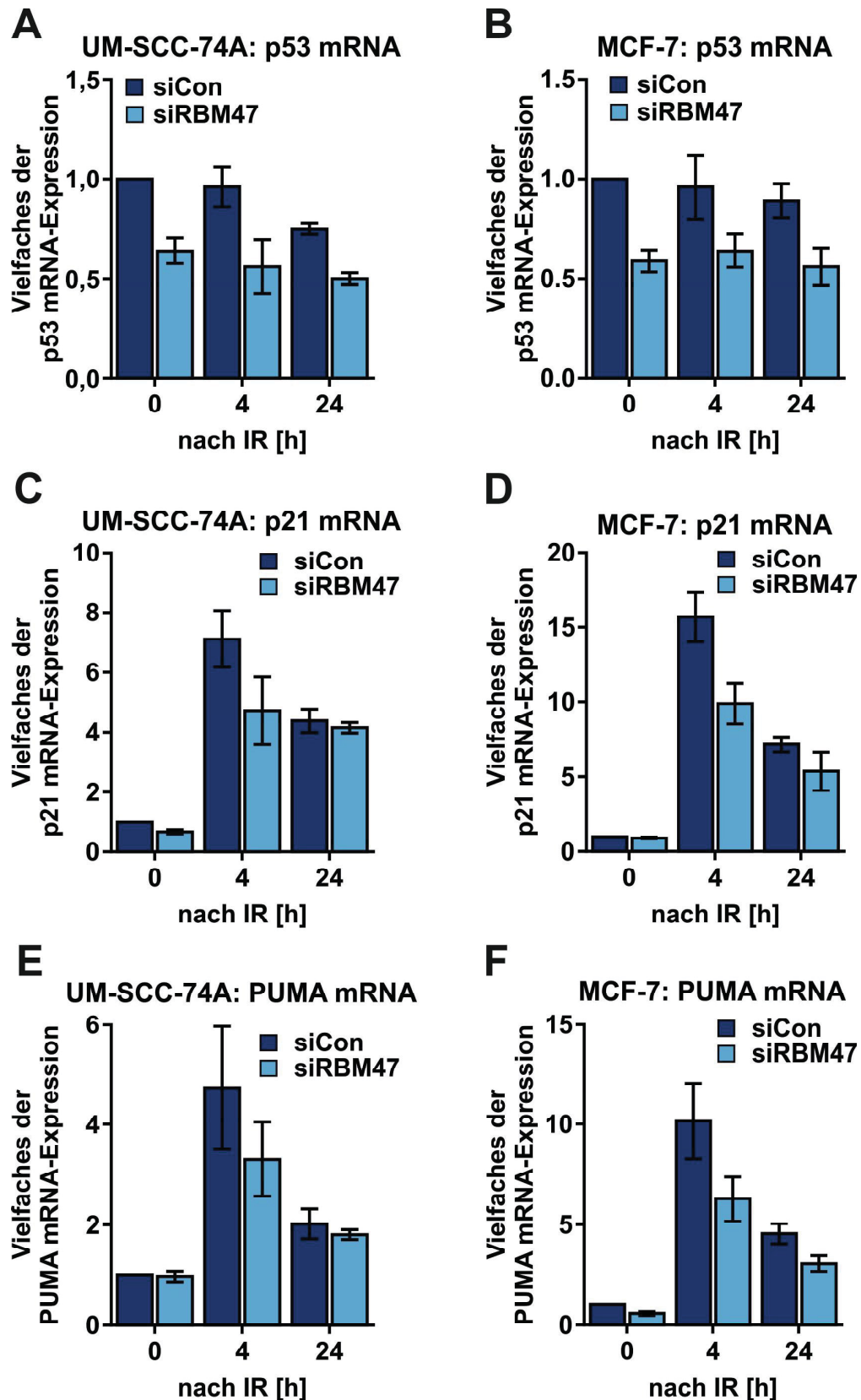
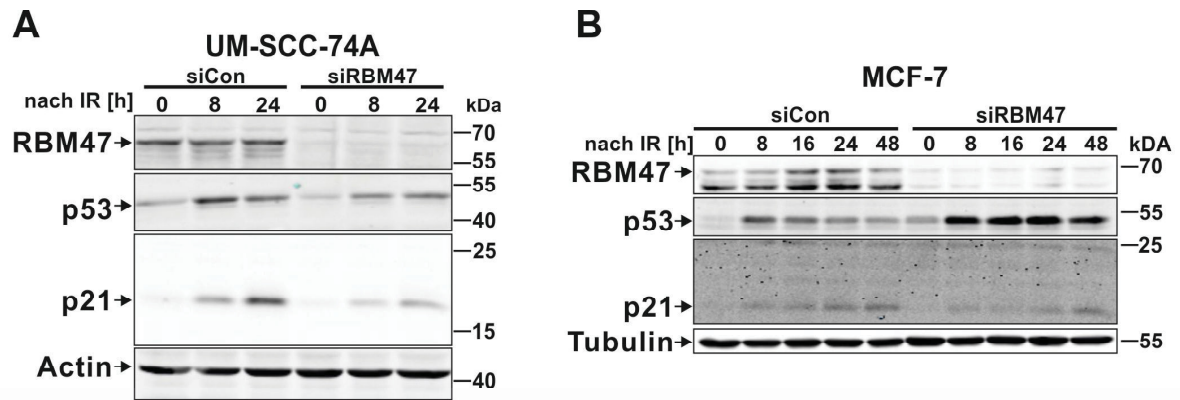


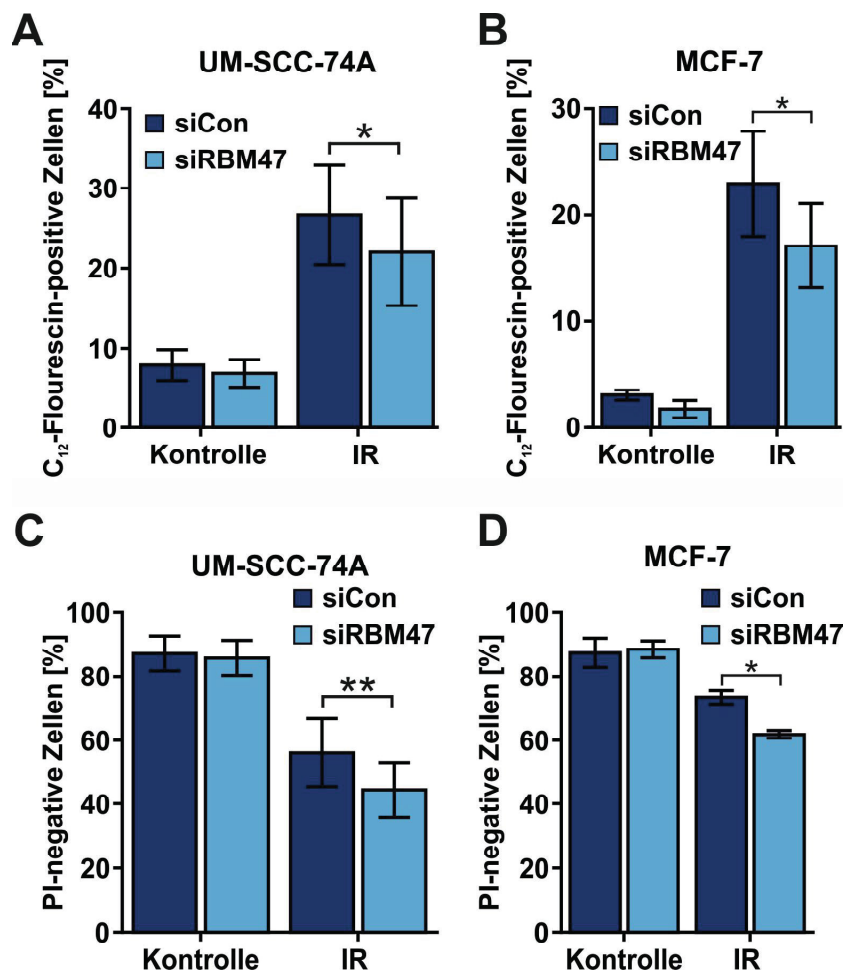
Abbildung 32: In UM-SCC-74A und MCF-7 ist die mRNA-Expression von p53 und seinen Zielgenen nach siRNA-Knockdown von RBM47 verringert.

UM-SCC-74- (A, C, E) und MCF-7-Zellen (B, D, E) wurden mit RBM47-siRNA (siRBM47) oder Kontroll-siRNA (siCon) transfiziert und 48h später bestrahlt. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach IR wurde die RNA der Zellen isoliert und die mRNA-Menge von p53 (A, B), p21 (C, D) und PUMA (E, F) mittels Real-time PCR quantifiziert. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten.



**Abbildung 33:** In UM-SCC-74A-Zellen nimmt die p53-Proteinexpression nach *Knockdown* von RBM47 ab, in MCF-7-Zellen steigt sie jedoch an, während die p21-Proteinexpression in beiden Zelllinien supprimiert ist.

UM-SCC-74A- (A) und MCF-7-Zellen (B) wurden mit siRNAs gegen RBM47 (siRBM47) oder Kontroll-siRNAs (siCon) transfiziert und 48 h später mit IR stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach IR wurden Zellextrakte gewonnen und auf die Expression von RBM47, p53 und p21 analysiert. Actin bzw. Tubulin dienten als Ladekontrolle. Die gezeigten Western Blots sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

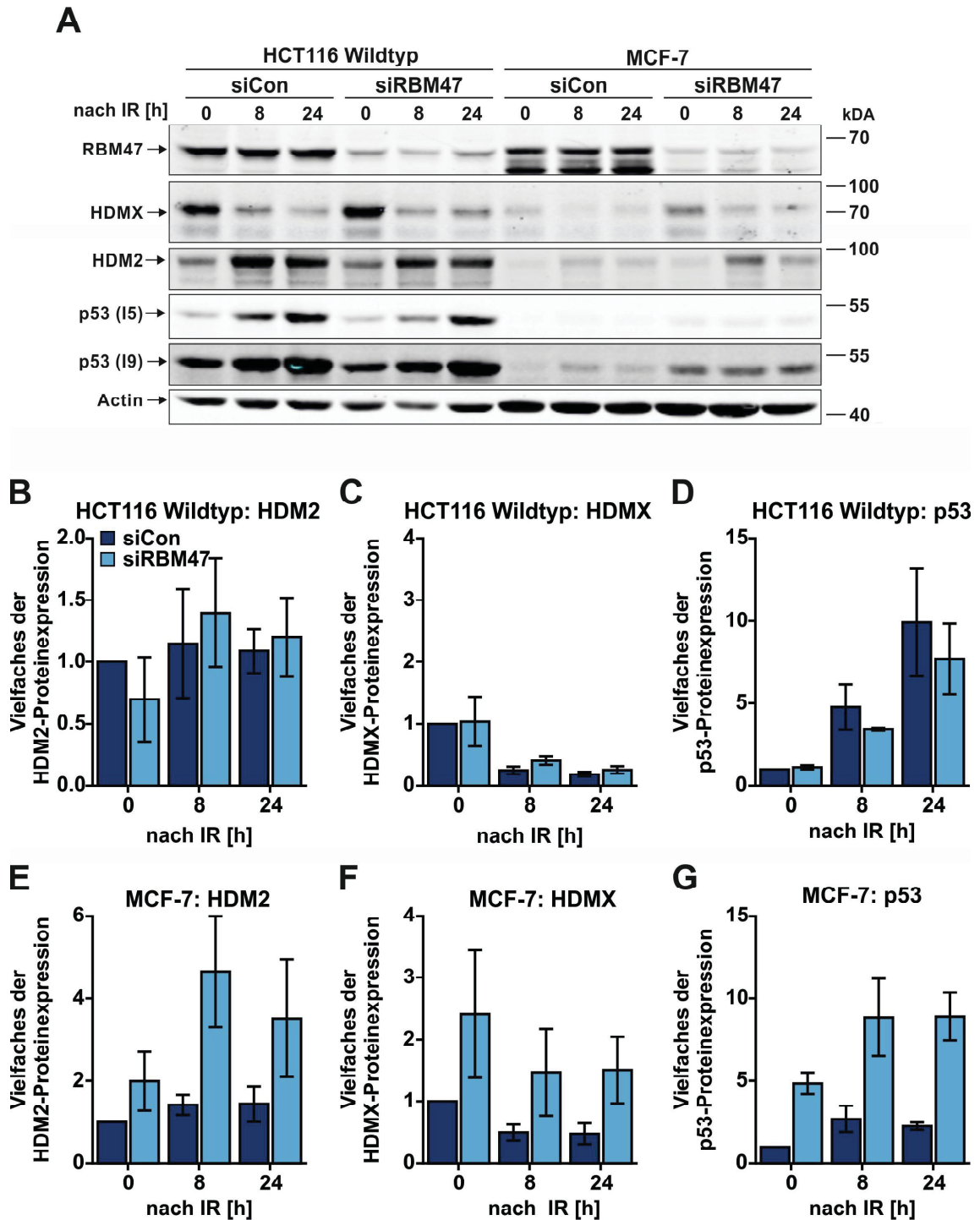


**Abbildung 34:** Der *Knockdown* von RBM47 verringert die Zahl seneszenten Zellen in UM-SCC-74A- und MCF-7-Zellen.

48 h nach der Transfektion mit Kontroll-siRNA (siCon) oder einer siRNA gegen RBM47 (siRBM47) wurden UM-SCC-74A- (A, C) und MCF-7-Zellen (B, D) mit 20 Gy bestrahlt. Die Messung der SA- $\beta$ -Gal-Aktivität (A, B) und Aufnahme von PI (C, D) erfolgte 72h nach IR. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Allerdings stimmen die Beobachtungen der mRNA-Expression der p53-Zielgene (Abbildung 32D, F) und des Zellschicksals (Abbildung 34B, D) nach dem *Knockdown* von RBM47 nicht mit der erhöhten p53-Proteinexpression (Abbildung 33B) in den MCF-7-Zellen überein. Auf Grund der verringerten Transkription der Zielgene scheint das p53-Protein daher trotz seiner erhöhten Expression inaktiv zu sein. Zusätzlich ist die p53 mRNA-Expression entgegen der Proteinexpression verringert. Dies legt nahe, dass RBM47 die p53-Proteinexpression in den MCF-7-Zellen zusätzlich auf translationaler oder post-translationaler Ebene reguliert. Die p53-Proteininstabilität und damit die p53-Proteinexpression wird vor allem auf post-translationaler Ebene durch die Ubiquitinligase HDM2 und ihr Homolog HDMX reguliert, welche für die effektive von HDM2-vermittelte Ubiquitinierung benötigt werden. Allerdings wurde auch beschrieben, dass HDMX nicht nur in der Lage ist, zur Ubiquitinierung des p53-Proteins beizutragen. Stattdessen kann HDMX unter bestimmten Bedingungen p53 stabilisieren (Jackson & Berberich, 2000; Stad et al., 2000), aber gleichzeitig auch die Transaktivierungsfunktion inhibieren (Jackson & Berberich, 2000; Migliorini et al., 2002), was den hier gemachten Beobachtungen entspricht. Wie zuvor erwähnt, bindet RBM47 die HDM2 und HDMX mRNAs (Vanharanta et al., 2014), weshalb es einen potentiellen Einfluss von RBM47 auf die Expression der beiden p53-Regulatoren geben könnte. Um zu überprüfen, ob sich deren Expression verändert, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Es wurden parallel MCF-7 und HCT116 -Zellen analysiert, um eine mögliche differentielle Regulation zwischen den beiden Zelllinien festzustellen. Sowohl HDM2, als auch HDMX zeigten in HCT116 Wildtyp- und MCF-7-Zellen ihr durch Behandlung mit IR hervorgerufenen Expressionsmuster (Abbildung 35). Die Expression von HDM2 nahm nach der Bestrahlung zu (Abbildung 35A, B, E) da HDM2 ein Zielgen von p53 ist (Wu et al., 1993). Im Gegensatz dazu nahm die Expression von HDMX wie erwartet ab (Abbildung 35A, C, F) da HDMX nach IR auf Grund von HDM2-vermittelter Ubiquitinierung degradiert wird (Chen et al., 2005). Die Transfektion von HCT116 Wildtyp-Zellen mit siRNA gegen RBM47 führte zu keiner Veränderung der Expression von HDMX und HDM2 (Abbildung 35B, C). Im Gegensatz dazu nahm die Expression beider Proteine durch Verringerung der RBM47-Expression in MCF-7-Zellen zu (Abbildung 35E, F), wobei das jeweilige IR-induzierte Expressionsmuster vorhanden blieb. Da beide Proteine die p53-Proteininstabilität gemeinsam beeinflussen, könnte diese Veränderung der HDM2- und HDMX-Expression eine Ursache für die Zunahme der p53-Proteinexpression durch den *Knockdown* von RBM47 in MCF-7-Zellen sein (Abbildung 33B, Abbildung 35A, D, G).

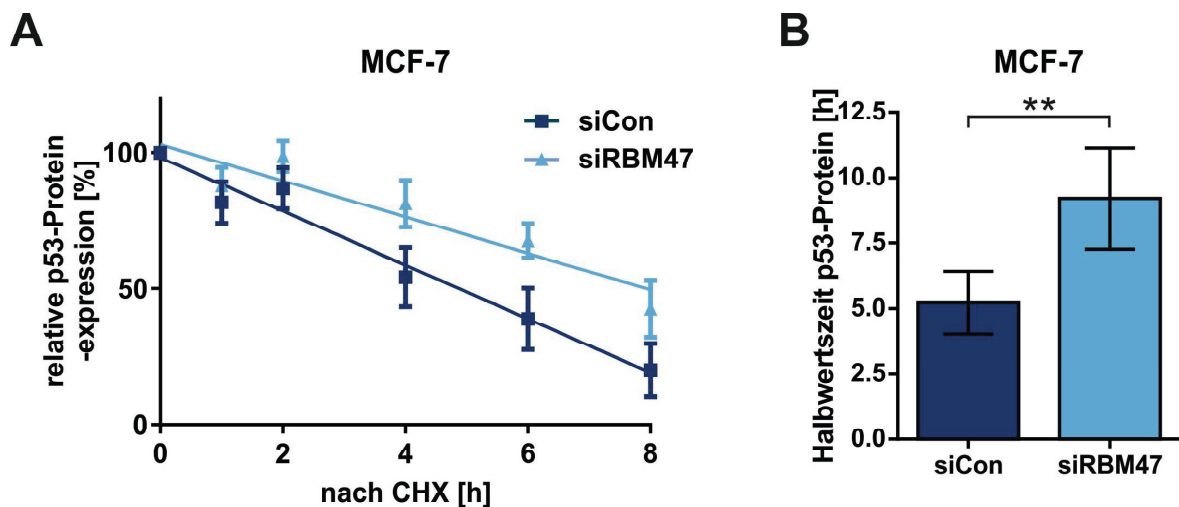




**Abbildung 35: Der Knockdown von RBM47 erhöht die Expression von HDM2, HDMX und p53 in MCF-7-Zellen, aber nicht in HCT116 Wildtyp-Zellen.**

HCT116 Wildtyp- und MCF-7-Zellen wurden mit RBM47-siRNA (siRBM47) oder Kontroll-siRNA (siCon) transfiziert und 48 h später mit 20 Gy bestrahlt. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Zellextrakte durch Western Blot auf die Expression der angegebenen Proteine mittels Western Blot (A) analysiert und densitometrisch quantifiziert (B-G). Actin diente als Ladekontrolle. Um die unterschiedlich hohe p53-Expression in beiden Zelllinien darzustellen, wurden die Membranen in zwei verschiedenen Intensitäten (I) angeregt und gescannt. Die gezeigten Western Blots sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente. Die dargestellten Densitometrien (B-G) sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Daher wurde untersucht, ob eine Veränderung der Proteinstabilität die Ursache für die angestiegene p53-Proteinexpression war. Dafür wurden die Zellen nach der Transfektion mit einer siRNA gegen RBM47 oder einer Kontroll-siRNA zur Stabilisierung des p53-Proteins bestrahlt und zwei Stunden später mit dem Translations-Inhibitor Cycloheximid (CHX) inkubiert, was zu einem Stopp der Proteinbiosynthese führt. An mehreren Zeitpunkten nach der CHX-Gabe wurde die vorhandene p53-Proteinmenge densitometrisch quantifiziert. In Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, nahm die p53-Proteinmenge schneller ab, als in Zellen, in denen durch siRNA-Transfektion weniger RBM47 exprimiert wurde (Abbildung 36A). Demzufolge erhöht der *Knockdown* von RBM47 die Stabilität des p53-Proteins. Dies spiegelt sich auch in der aus der Regressionsgerade berechneten Halbwertszeit wider, welche durch die Verringerung der RBM47-Expression von 5 h auf über 9 h anstieg. Damit wird die Stabilität des p53-Proteins in MCF-7-Zellen auf post-translationaler Ebene durch RBM47, höchstwahrscheinlich indirekt über HDM2 und HDMX, beeinflusst. Weitere Experimente zur abschließenden Klärung dieses Sachverhalts konnten in dieser Dissertation aus Zeitgründen nicht durchgeführt werden.



**Abbildung 36: Der *Knockdown* von RBM47 erhöht die p53-Proteinstabilität in MCF-7-Zellen.**

MCF-7 Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit RBM47-siRNA (siRBM47) bzw. Kontroll-siRNA (siCon) zur Stabilisierung des p53-Proteins mit 20 Gy bestrahlt. Zwei Stunden nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit Cycloheximid (CHX, 10  $\mu$ M) behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Zugabe von CHX wurden Zellextrakte gewonnen, die mittels Western Blot analysiert wurden. Die Abnahme des p53-Proteins wurde densitometrisch quantifiziert (A) und aus der Regressionsgerade die Halbwertszeit des p53-Proteins bestimmt (B). Die dargestellten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

### 3.4.6 RBM47 verringert die Stabilität der p21 mRNA durch Bindung an ihre 3'UTR

In dieser Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass RBM47 die Expression von p21 auf transkriptioneller Ebene indirekt über die Kontrolle von p53 steuert (Kapitel 3.4.2). Durch die Reduktion der RBM47-Expression kam es in HCT116- und UM-SCC-74A-Zellen in

Folge einer verringerten p53-Proteinexpression zu einer geringeren transkriptionellen Aktivität dieses Tumorsuppressors und damit zu einer deutlich verringerten Induktion der p21 mRNA und –Proteinexpression (Kapitel 3.4.3). Allerdings wurde auch gezeigt, dass RBM47 die p21 mRNA in Abhängigkeit ihrer 3'UTR bindet (Kapitel 3.2). Daher ist anzunehmen, dass RBM47 ebenfalls einen direkten Effekt auf die p21 mRNA ausübt. Eine Schwierigkeit in der Untersuchung dieses Effekts liegt in der Tatsache, dass die mRNA-Expression von p21 durch transkriptionelle Aktivierung von p53 beeinflusst wird, weswegen experimentelle Methoden eingesetzt werden müssen, die möglichst unabhängig von dieser Aktivierung sind. Da bereits beschrieben wurde, dass RBM47 die Stabilität diverser mRNAs beeinflusst (Kapitel 1.3.3) (Vanharanta et al., 2014; Wei et al., 2018), sollte untersucht werden, ob dies auch bei der p21 mRNA der Fall ist. Dazu wurde deren Stabilität nach Transfektion in RBM47-depletierten HCT116 Wildtyp-Zellen analog zur Stabilität der p53 mRNA (Abbildung 23) durch Einsatz des Transkriptions-Inhibitors Actinomycin D (ActD) analysiert. Die Abnahme der mRNA wird dabei unabhängig von der vorhandenen Gesamtmenge an mRNA analysiert, da auf diese Gesamtmenge unter den jeweiligen Bedingungen normalisiert wird. Die Transfektion mit RBM47-siRNA führte zu einer geringeren Abnahme der p21 mRNA im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen (Abbildung 37A), d.h. die Halbwertszeit erhöhte sich von etwa 7 auf über 10 Stunden (Abbildung 37B). Da diese Zunahme der p21 mRNA-Stabilität unabhängig von einem p53-gesteuerten transkriptionellen Effekt von RBM47 sein sollte, wurde diese Untersuchung auch in p53-defizienten HCT116-Zellen durchgeführt, um dessen Unabhängigkeit von p53 zu zeigen. Erstaunlicherweise wurde die p21 mRNA-Stabilität in HCT116 p53<sup>-/-</sup> -Zellen durch die Reduktion von RBM47 durch siRNA nicht verändert. Der Abbau der p21 mRNA nach der Behandlung mit ActD zeigte in p53-defizienten Zellen keine Unterschiede zwischen Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen und Zellen, die mit siRNA gegen RBM47 transfiziert wurden (Abbildung 37C), sodass sich auch die Halbwertszeit nicht veränderte (Abbildung 37D). Daher scheint der direkte Effekt von RBM47 auf die p21 mRNA, der zu einer Destabilisierung der mRNA führt, ebenfalls von p53 abhängig zu sein. Da nicht auszuschließen ist, dass es sich hierbei um einen Artefakt der p53-defizienten Zellen handelt, wurde die p21 mRNA-Stabilität in HCT116 Wildtyp-Zellen analysiert, in denen die Expression von RBM47 und p53 gemeinsam durch Transfektion mit siRNAs verringert wurden. Während der alleinige *Knockdown* von RBM47, wie zuvor, zu einer Erhöhung der p21 mRNA-Halbwertszeit führte, veränderte sich deren Stabilität in Zellen, die mit siRNA gegen p53 transfiziert wurden, im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen nicht. Auch durch den gemeinsamen *Knockdown* von RBM47 und p53 war die Stabilität der p21 mRNA nicht modifiziert, was das Ergebnis aus der p53-defizienten Zelllinie bestätigt (Abbildung 37E, F). Demzufolge scheint nicht

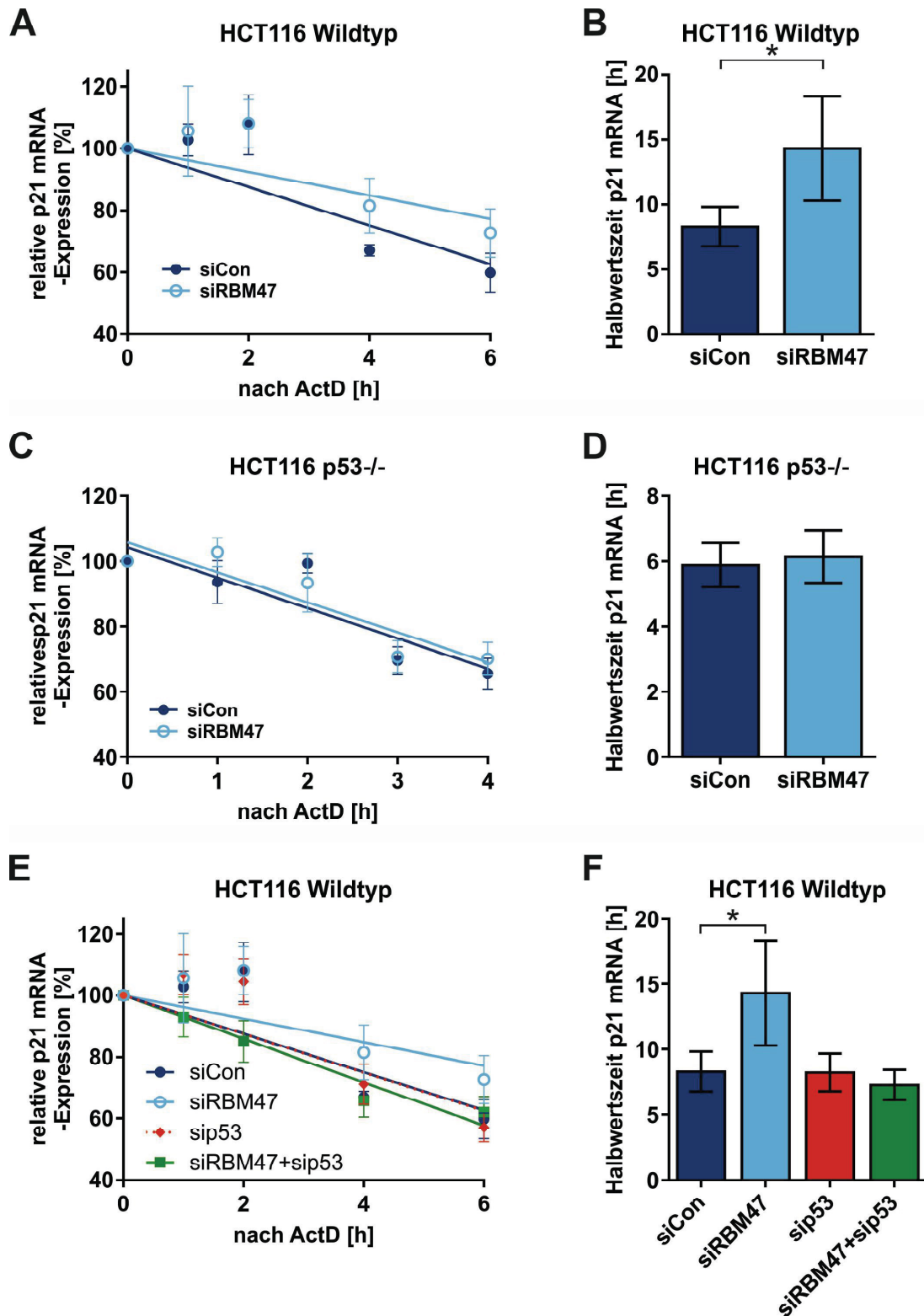
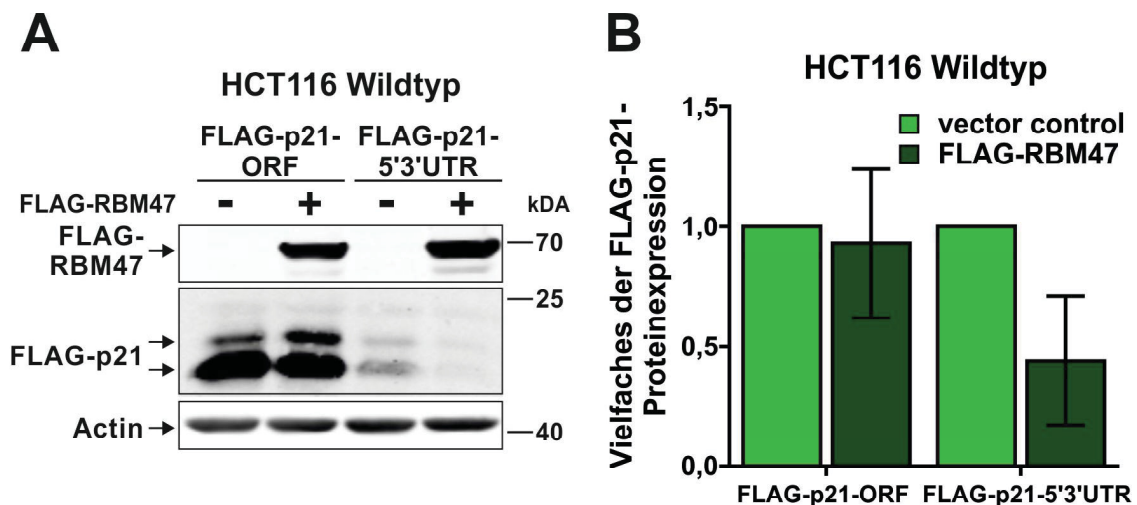


Abbildung 37: Der Knockdown von RBM47 stabilisiert die p21mRNA in Abhängigkeit von p53.

HCT116 Wildtyp- (A, B, E, F) und p53<sup>-/-</sup>-Zellen (C, D) wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und 48 h später mit 20 Gy bestrahlt. Nach drei Stunden wurden die Zellen mit Actinomycin D (ActD) inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten nach dieser Behandlung wurde die RNA isoliert und mittels qPCR quantifiziert (A, C, E). Aus den berechneten Regressionsgeraden wurde die Halbwertszeit der p21 mRNA bestimmt (B, D, F). Die dargestellten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Daten in A und B entsprechen den Daten in E und F.

nur der indirekte transkriptionale Effekt von RBM47 auf die p21-Expression von p53 abhängig zu sein, sondern auch der direkte, p21 mRNA-destabilisierende Effekt.

Da RBM47 die Stabilität der p21 mRNA verändert, ist zu vermuten, dass dieses auch die Translation und damit Expression vom p21-Protein beeinflussen könnte. Jedoch musste für weitere Analysen dieses direkten RBM47-Effekts dessen indirekter transkriptionaler Effekt ausgeschlossen werden. Hierfür wurden HCT116 Wildtyp-Zellen mit FLAG-p21-Konstrukten transfiziert, in denen die Expression von p21 nicht unter der Kontrolle des p21-Promotors stand, sondern unter Kontrolle eines konstitutiv-exprimierten CMV-Promotors. Während eines der Konstrukte nur den p21-ORF aufweist, enthält das andere Konstrukt neben dem p21-ORF auch die p21-5'UTR und p21-3'UTR, sodass die Expression des p21-ORF in An- und Abwesenheit der UTRs analysiert werden konnte. Auf Grund der großen 3'UTR (~1500 bp) und den darin zahlreich enthaltenen regulatorischen Sequenzen wurde das FLAG-p21-5'3'UTR-Konstrukt im Vergleich zum p21-ORF-Konstrukt in wesentlich geringerem Ausmaß exprimiert. Dennoch verringerte sich die Expression des FLAG-p21-Plasmids durch Überexpression von FLAG-RBM47 nur in Anwesenheit der 5'3'UTR (Abbildung 38A). Diese Beobachtungen wurden zusätzlich durch eine densitometrischen Quantifizierung bestätigt (Abbildung 38B).

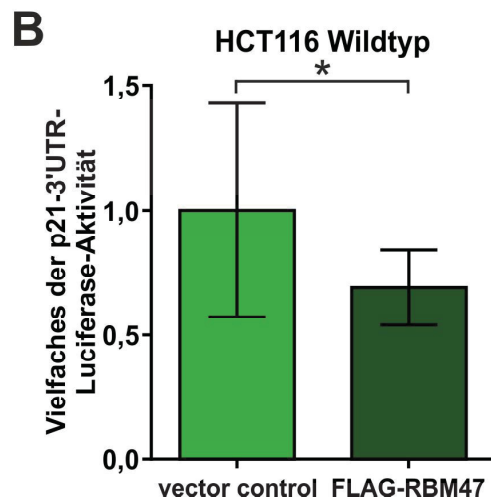


**Abbildung 38: RBM47 verringert die Expression von FLAG-p21 in Abhängigkeit von der 3'UTR.**

HCT116 Wildtyp-Zellen wurden mit FLAG-RBM47 und einem FLAG-p21-Konstrukt transfiziert, das den p21-ORF ± 5'3'UTR enthält. Zellextrakte wurden 24 h nach der Transfektion gewonnen und im Western Blot analysiert. (A) Die gezeigten Western Blots sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente. (B) Die Expression von FLAG-p21 wurde mittels Densitometrie quantifiziert. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus vier unabhängig durchgeführten Experimenten.

Dies zeigt eindeutig, dass die durch die direkte Bindung an die 3'UTR hervorgerufene Destabilisierung der p21 mRNA ursächlich für die nach der RBM47-Transfektion beobachtete Inhibition des p21-5'3'UTR Expression ist. Zur weiteren Verifizierung dieser Beobachtungen wurde die Aktivität einer konstitutiv exprimierten Luciferase in Abhängigkeit von der p21-3'UTR bestimmt, welche sich *downstream* des Luciferase-Gens befand und mit in die transkribierte Luciferase mRNA eingebaut wurde (Abbildung 39A).





**Abbildung 39: RBM47 verringert die p21-3'UTR-abhängige Luciferase-Aktivität**

HCT116 Wildtyp-Zellen wurden mit FLAG-RBM47 und einem Luciferase-Konstrukt transfiziert, welches die p21-3'UTR enthält (A). Die Luciferase-Aktivität wurde 24 h nach der Transfektion bestimmt (B). Die dargestellten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus acht unabhängig durchgeführten Experimenten.

Durch Überexpression von FLAG-RBM47 nahm die Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit der p21-3'UTR ab (Abbildung 39B), wie zuvor auch die Proteinexpression des FLAG-p21-Konstrukts.

Aus den vorliegenden Daten lässt sich schließen, dass RBM47 die Stabilität der p21 mRNA durch 3'UTR-abhängige Bindung verringert. Da dieser Effekt aber nur in Zellen beobachtet werden konnte, die p53 exprimieren, scheint auch dieser direkte Mechanismus von p53 abhängig zu sein. Die Destabilisierung der p21 mRNA führte in Abhängigkeit von der 3'UTR zu einer Verringerung der Proteinexpression auf translationaler Ebene. Allerdings scheint dieser Mechanismus im eingesetzten Zellsystem nur eine untergeordnete zu Rolle spielen, da die Zunahme der p21-Transkription durch den indirekten Einfluss von RBM47 auf p53 die direkte inhibierende Wirkung auf p21 überlagert.

## 4. Diskussion

Um möglichen onkogenen Entwicklungen vorzubeugen, ist es für eine Zelle von großer Bedeutung, nach einem schädigenden Stimulus den Zellzyklus stoppen zu können. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, Schäden zu reparieren, oder, falls diese zu groß sind, terminale Zellschicksale wie Apoptose oder Seneszenz einzuleiten. An diesen Vorgängen ist der p53-p21-Signalweg maßgeblich beteiligt. Der Tumorsuppressor p53, der durch verschiedene schädigende Signale aktiviert wird, initiiert in Abhängigkeit vom Stimulus die Transkription verschiedener Zielgene, die das Zellschicksal regulieren (Kastenhuber & Lowe, 2017). Durch die Expression von PUMA und NOXA kommt es zur Einleitung der Apoptose (Haupt et al., 2003), wohin gegen die Induktion des CDK-Inhibitors p21 zur Seneszenz führt (Kruiswijk et al., 2015). Dabei ist p21 nicht nur in der hier untersuchten Seneszenz nach einer DNA-Schädigung essentiell, sondern wird auch in fast allen anderen Formen der Seneszenz, wie z.B. nach oxidativem Stress oder Onkogen-Aktivierung, unbedingt benötigt (Munoz-Espin & Serrano, 2014). Da p53 und p21 verschiedene Funktionen besitzen und ihre Expression zur Induktion terminaler, und damit irreversibler Zellschicksale führen kann, muss die Expression von p53 und p21 strikt reguliert werden. In den letzten Jahren haben andere Studien gezeigt, dass dabei translationale Mechanismen, die z.B. von RBPs vermittelt werden können, eine große Rolle spielen (Zhang & Chen, 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte vor diesem Hintergrund gezeigt werden, dass RBM47 die Expression von p53 auf transkriptioneller Ebene kontrolliert. Dadurch nimmt RBM47 Einfluss auf die Expression der p53-Zielgene und damit auch auf p53-abhängige Stressantworten, wie z.B. die Induktion der Seneszenz. Zusätzlich verringert RBM47 auf translationaler Ebene die Stabilität der p21 mRNA auf Grund seiner 3'UTR-abhängigen Bindung an die p21 mRNA. Darüber hinaus lassen initiale Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit vermuten, dass auch der p38-MAPK-Signalweg eine mögliche Rolle in der RBP-vermittelten p21-Regulation spielen könnte, da dieser nicht nur wie RBM47 die Expression von p21 auf translationaler Ebene kontrolliert, sondern auch die Aktivitäten von RBPs. Ob p38 hierbei auch RBM47 reguliert, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

### 4.1 ERK, JNK und p38 regulieren die p21-Expression auf verschiedenen Ebenen

MAPK sind Signal-transduzierende Kinasen, die durch eine Phosphorylierungskaskade nach einem extrazellulären Stimulus aktiviert werden und verschiedener Zielproteine regulieren. Die drei Hauptgruppen der MAPK -ERK, JNK/SAPK und p38- stehen nach

Aktivierung durch verschiedene Stimuli in Verbindung mit der Regulierung des Zellschicksals, des Zellzyklus oder der Apoptose. Nach DNA-Schädigung ist p21 ein wichtiger Faktor, der im DDR-Signalweg an der Einleitung eines Zellzyklusarrest und auch der Seneszenz maßgeblich beteiligt ist. Bei der Untersuchung MAPK-vermittelten p21-Expression konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass alle drei MAPK an der Regulation von p21 nach DNA-Schädigung beteiligt waren (Kapitel 3.3). Allerdings scheint für die RBM47-abhängige translationale Kontrolle der p21-Expression nur p38 in Frage zu kommen, da ERK und JNK diese Prozesse zumindest in den hier verwendeten HCT116-Zellen auf anderen Ebenen kontrollieren.

ERK wird in HCT116-Zellen für die Regulation von p21 auf post-translationaler Ebene nach DNA-Schädigung benötigt (Tabelle 19A). Eine solche post-translationale Regulation konnte auch in anderen Studien gezeigt werden. So führte die Aktivierung des MEK-ERK-Signalwegs durch induzierbares Raf-1 in Myoblasten zu einer Stabilisierung des p21-Proteins (Ostrovsky & Bengal, 2003). Die Ursache hierfür könnte die ERK-abhängige Inhibition des Proteasom-vermittelten Abbaus von p21 nach Ras-Aktivierung sein. In Ras-transformierten Fibroblasten nimmt neben der p21-Expression auch die Expression von Cyclin D1 zu, welches durch Bindung an das p21-Protein dessen Proteasom-Bindungsmotiv maskiert und den p21-Abbau verhindert (Coleman et al., 2003). Durch die Inkubation mit dem JNK-Inhibitor SP600125 nahm die p21-Proteinexpression ab, jedoch konnte mittels der verwendeten Methoden nicht abschließend geklärt werden, auf welcher Ebene diese MAPK die p21-Expression nach DNA-Schädigung reguliert (Tabelle 19B). Daher sind weitere Analysemethoden nötig, um den Effekt von JNK auf die p21-Expression weiter zu untersuchen.

**Tabelle 19: Übersicht über die Veränderung der p21-Expression auf den verschiedenen Ebenen nach Behandlung mit dem ERK-Inhibitor U0126 (A) bzw. dem JNK-Inhibitor SP600125 (B).**

Grüne Pfeile symbolisieren die Zunahme, rote Pfeile die Abnahme der Expression, wobei die Größe der Pfeile die Stärke des Einflusses darstellt. Bei einem schwarzen Strich kam es zu keiner Expressionsveränderung.

U0126 (ERK)	Expressionsveränderung		SP600125 (JNK)	Expressionsveränderung	
	basal	IR		basal	IR
p21-Proteinexpression	—	↓	p21-Proteinexpression	↑	↓
p21 mRNA-Expression	—	—	p21 mRNA-Expression	↑	—
translational (Expression FLAG-p21)	—	—	translational (Expression FLAG-p21)	—	—
post-translational (Expression FLAG-p21)	↓	↓	post-translational (Expression FLAG-p21)	—	—
translational (Luciferase-p21-3'UTR-Aktivität)	↓	—	translational (Luciferase-p21-3'UTR-Aktivität)	↑	↑

Im Gegensatz zu den anderen beiden MAPK hatte p38 den gesuchten translationalen Effekt auf die p21-Expression nach DNA-Schädigung. So nahm sowohl die p21-Proteinexpression, als auch die p21 mRNA-Expression nach Behandlung mit dem p38-Inhibitor SB203580 nach IR ab (Tabelle 20). Auch wenn p38 den Tumorsuppressor p53 an verschiedenen Stellen, wie an Serin15 (She et al., 2000), phosphoryliert, was die Interaktion zu HDM2 unterbindet (Shieh et al., 1997), war die Expression von p53 nach Inhibition von p38 nicht verändert. Daher ist nicht anzunehmen, dass die Veränderung der mRNA-Expression von p21 auf eine modifizierte transkriptionelle Aktivität von p53 zurück zu führen ist. Da bereits in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass p38 für die transkriptionelle Elongation von p21 benötigt wird (Kumari et al., 2013), könnte dies die Ursache für die verringerte p21 mRNA-Expression sein. Auf post-translationaler Ebene wird die p21-Proteininstabilität wiederum durch Phosphorylierung an Threonin57 und Serin130 durch p38 erhöht (Kim et al., 2002). Allerdings konnte in dieser Dissertation keine Regulation auf post-translationaler Ebene beobachtet werden (Tabelle 20), sodass dieser Regulationsmechanismus für das HCT116-Zellsystem ausgeschlossen werden kann. Die weiteren Analysen zeigten, dass p38 die p21-Expression auf translationaler Ebene steuert. Da ein Einsatz des p38-Inhibitors zu einer reduzierten mRNA-Expression führte (Tabelle 20), kann davon ausgegangen werden, dass p38 die Stabilität der p21 mRNA erhöht. Ein transkriptioneller Wirkmechanismus ist zwar nicht völlig auszuschließen, scheint aber auf Grund dieser Daten eher unwahrscheinlich.

Die positive Wirkung auf die Stabilität der p21 mRNA durch p38 wurde auch in U937-Lymphom-Zellen gezeigt, in denen es nach Stimulation mit Stickstoffmonoxid zur einer p38-abhängigen Zunahme der p21 mRNA und –Proteinexpression kam (Cui et al., 2005). Da p38 keine RNA-bindende Domäne aufweist, kann basierend auf dem aktuellen

**Tabelle 20: Übersicht über die Veränderung der p21-Expression auf den verschiedenen Ebenen nach Stimulation mit dem p38-Inhibitor SB203580.**

*Grüne Pfeile symbolisieren die Zunahme, rote Pfeile die Abnahme der Expression, wobei die Größe der Pfeile die Stärke des Einflusses darstellt. Bei einem schwarzen Strich kam es zu keiner Expressionsveränderung.*

SB203580 (p38)	Expressionsveränderung	
	basal	IR
p21-Proteinexpression	—	↓
p21 mRNA-Expression	—	↓
translational (Expression FLAG-p21)	↓	↓
post-translational (Expression FLAG-p21)	—	—
translational (Luciferase-p21-3'UTR-Aktivität)	↓	↓

Wissensstand angenommen werden, dass RBPs diesen Effekt vermitteln. Es ist bekannt, dass p38 RBPs reguliert, die AU-reiche Elemente (AREs) binden (Dean et al., 2004), und so eine Rolle in der Stabilisierung von mRNAs spielt, die AREs in ihrer 3'UTR besitzen (Chen & Shyu, 1995). Auch in der 3'UTR der p21 mRNA befinden sich AREs, mit denen verschiedene ARE-bindende RBPs interagieren (Joseph et al., 1998; Wang et al., 2000). Eines dieser RBPs, welches Ziel einer Phosphorylierung von p38 ist, ist das *KH-type splicing regulatory*-Protein (KSRP), welches für den Abbau vieler ARE-enthaltender mRNAs benötigt wird. So wurde durch die Aktivierung von p38 in der Muskelzellendifferenzierung in C2C12-Zellen die p21 mRNA-Stabilität in Abhängigkeit der p38-vermittelten Phosphorylierung von KSRP erhöht, da diese Modifikation die Interaktion des RBPs zu der mRNA unterbindet (Briata et al., 2005). Interessanterweise konnte für die mRNA der induzierbaren Stickstoffoxid-Synthase gezeigt werden, dass KSRP dieselbe Bindesequenz besitzt, mit der auch das RBP HuR interagiert, und dass beide RBPs um diese Bindestelle konkurrieren (Linker et al., 2005). Da auch die p21 mRNA von HuR gebunden wird, ist es denkbar, dass nach einer Aktivierung von p38 die Interaktion von KSRP zur p21 mRNA unterbunden, und die Bindung von HuR p38-abhängig erhöht wird. Zwar konnte eine Zunahme der Bindung von HuR an die p21 mRNA nach p38-Aktivierung in C2C12-Zellen nicht bestätigt werden (Briata et al., 2005). Jedoch konnte nach  $\gamma$  Bestrahlung in Kolon-Karzinom-Zellen gezeigt werden, dass p38 HuR an Threonin118 phosphoryliert. Diese Veränderung führte durch eine erhöhte Bindung von HuR an die p21 mRNA zu ihrer Stabilisierung, was einen G<sub>1</sub>-Arrest zur Folge hatte (Lafarga et al., 2009). Daher ist es denkbar, dass es durch die p38-vermittelten Phosphorylierungen zu einer Abnahme der Bindung von destabilisierenden und einer Zunahme von stabilisierenden Faktoren an der p21 mRNA kommt. Dies könnte auch die Ursache der in dieser Arbeit gefundenen Abhängigkeit der p21-Expression von p38 sein. Um den Einfluss der beiden Faktoren durch p38-vermittelte Phosphorylierung auf die p21-Expression zu analysieren, müsste zunächst der Effekt von p38 auf die p21 mRNA-Stabilität durch einen mRNA-Stabilitätsanalyse im verwendeten System (HCT116-Zellen, Stimulation mit IR) verifiziert werden.

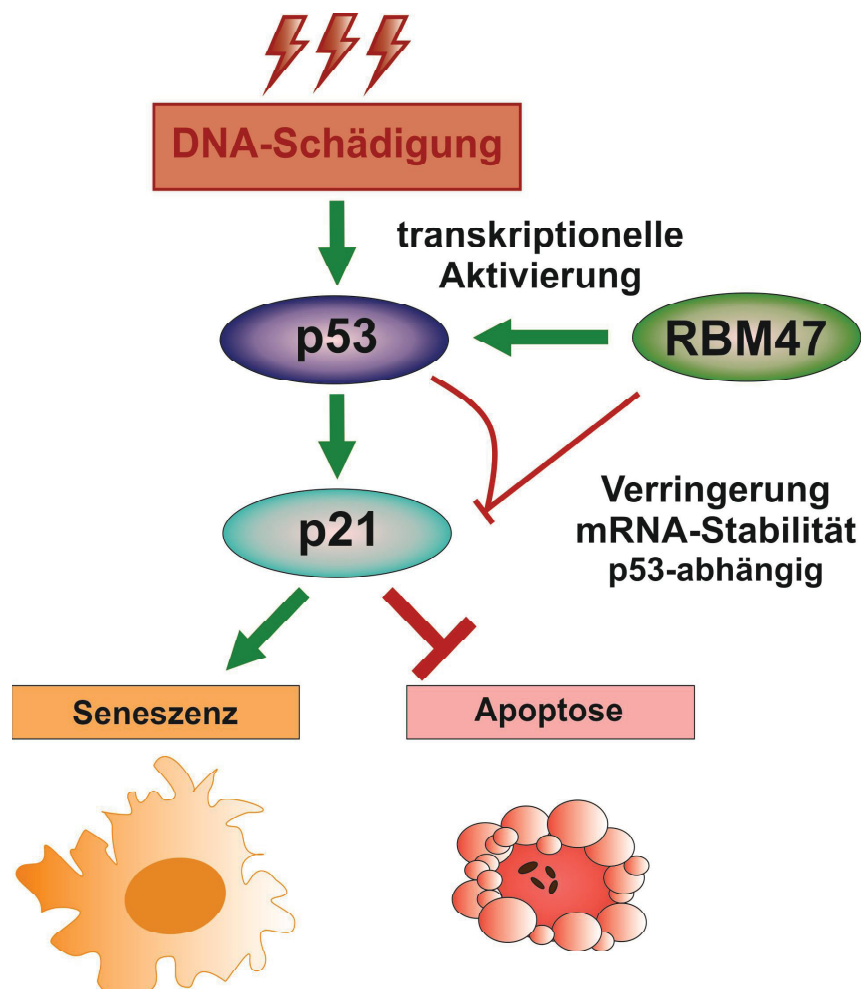
Es ist nicht auszuschließen, dass auch RBM47 an der p38-vermittelten p21-Regulation beteiligt ist. RBM47 erhöht die Stabilität der IL-10 mRNA in Abhängigkeit der AREs dieses Transkripts (Wei et al., 2018). Daher ist es möglich, dass RBM47 zu den ARE-bindenden RBPs gehört, die von p38 reguliert werden. Durch Bindung an die AREs der p21 mRNA könnte RBM47 einen p38-abhängigen translationalen Mechanismus in der p21-Expression vermitteln. Allerdings zeigten die in dieser Arbeit parallel durchgeführten Experimente, dass RBM47 die Regulation der p21-Expression hauptsächlich indirekt auf transkriptioneller Ebene durch p53 steuert. Da der translationale Effekt auf die



p21 mRNA-Stabilität ebenfalls von p53 abhängig war, wurde die Bedeutung von RBM47 in der MAPK-vermittelten translationalen Kontrolle der p21-Expression nicht weiterverfolgt.

## 4.2 RBM47 reguliert den p53-p21-Signalweg durch unterschiedliche Mechanismen

In dieser Arbeit wurde die Funktion von RBM47, einem Protein, welches kürzlich als RBP beschrieben wurde, im p53-p21-Signalweg nach DNA-Schädigung untersucht. Dabei zeigte sich, dass RBM47 diesen Signalweg auf duale Weise reguliert. Auch wenn RBM47 im Labor für Molekulare Radioonkologie in Vorarbeiten zu dieser Dissertation in einem *Screening* als direktes Bindeprotein der p21 mRNA identifiziert wurde, reguliert das RBP neben der p21 mRNA-Stabilität auch die Expression von p53 und damit indirekt auch die von p21 auf transkriptioneller Ebene (Abbildung 40).



**Abbildung 40: RBM47 reguliert den p53-p21-Signalweg transkriptionell und translational.**

*RBM47 wird für die transkriptionelle Expression von p53 nach DNA-Schädigung benötigt, wodurch es auch die Expression von p21 als p53-Zielgen und damit die Entscheidung über das einzugehende Zellschicksal indirekt beeinflusst. Darüber hinaus besitzt RBM47 in HCT116-Zellen einen direkten negativen Effekt auf die p21 mRNA-Stabilität, welcher ebenfalls von p53 abhängig ist. Allerdings wird dieser Mechanismus im verwendeten Zellsystem vom p53-abhängigen Einfluss überdeckt.*

#### 4.2.1 RBM47 reguliert die p53-Expression transkriptionell und beeinflusst so die p21-Induktion und das Zellschicksal nach DNA-Schädigung

Trotz einer Verbindung von RBM47 zum p53-DNA-Schädigungssignalweg war die Expression von RBM47 weder DNA-Schädigungs-, noch p53-abhängig reguliert (Abbildung 18). Im Gegensatz dazu hatte RBM47 aber eine Wirkung auf die p53-Expression, da die p53-Expression nach dem *Knockdown* von RBM47 reduziert war (Abbildung 19). Es lag zunächst nahe, dass RBM47 p53 auf post-translationaler Ebene reguliert, da p53 durch HDM2 und HDMX für den Abbau markiert wird. Es konnte bereits gezeigt werden, dass RBM47 sowohl an die mRNA von HDM2, als auch von HDMX bindet. Diese Ergebnisse wurden mit einer Hochdurchsatz-Methode (HITS-CLIP: *High throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation*) unter Überexpression von FLAG-RBM47 in einer Gehirn-metastasierenden Brustkrebszelllinie (MDA-MB-231-BrM2) mit geringer RBM47-Expression im Vergleich zur parentalen Zelllinie (MDA-MD-231) gewonnen. Dabei konnte nur an der HDMX mRNA ein regulatorischer Effekt durch die Bindung des RBM47-Proteins nachgewiesen werden, der zu einem Ausschluss eines Kassettenexons (Exon 6) führte. Allerdings wurden in dieser Publikation keine weiteren Untersuchungen zur Auswirkung dieser Modifikation vorgenommen (Vanharanta et al., 2014). Jedoch ist bekannt, dass das Fehlen von Exon 6 in der HDMX mRNA die Expression eines verkürzten Proteins, HDMX-S zur Folge hat (Mancini et al., 2009; Rallapalli et al., 1999), welches die Aktivität von p53 effektiver inhibiert als HDMX (Rallapalli et al., 2003). In dieser Arbeit konnte im Western Blot mit den verwendeten Antikörpern jedoch kein Signal für HDMX-S detektiert werden, sodass keine Aussage darüber getroffen werden konnte, ob dieser Mechanismus auch in den HCT116 Wildtyp-Zellen vorliegt. Da aber keine veränderte Regulation der p53-Proteinstabilität gezeigt werden konnte (Abbildung 21), ist es fraglich, ob das modifizierte *Splicing* in dieser Zelllinie eine Rolle spielt bzw. ob dieser Mechanismus einen Einfluss auf p53 besitzt. Darüber hinaus wurden die Ergebnisse von Vanharanta et al. mittels Überexpressionsanalysen gewonnen, was zu Beobachtungen führen kann, die unter normalen Bedingungen nicht auftreten. Daher müsste weiter untersucht werden, welchen Effekt RBM47 unter physiologischen Bedingungen, z.B. durch einen *Knockdown* mit siRNA, auf das HDMX-*Splicing* besitzt und welche Folgen dies für die Expression von Proteine hat, die von HDMX beeinflusst werden.

Auch die naheliegende Vermutung, dass RBM47 als RBP p53 auf mRNA-Ebene reguliert, konnte nicht bestätigt werden. Zwar wurde bereits beschrieben, dass RBM47 die Stabilität verschiedener mRNAs durch Bindung an die 3'UTR sowohl erhöhen, wie z.B. die der DDK1 mRNA (Vanharanta et al., 2014), als auch verringern kann, wie bei der IL-10 mRNA (Wei et al., 2018). Jedoch wirkte sich eine Reduktion der RBM47-

Proteinexpression nicht auf die p53 mRNA-Stabilität aus (Abbildung 23). Trotzdem konnte eine starke Abnahme der totalen p53 mRNA-Menge nach dem *Knockdown* von RBM47 detektiert werden (Abbildung 22), was auf einen transkriptionellen Mechanismus schließen ließ, der mit Hilfe von Luciferase-basierten p53-Promotoraktivitätstests bestätigt wurde (Abbildung 24). Da RBM47 nicht in der Lage ist, DNA zu binden (Guan et al., 2013), ist eine direkte Auswirkung auf den p53-Promotor nicht anzunehmen. Stattdessen besteht die Möglichkeit, dass RBM47 transkriptionelle Aktivatoren des p53-Promotors positiv beeinflusst oder Inhibitoren reprimiert. Zwar sind verschiedene Faktoren bekannt, welche die p53-Promotoraktivität regulieren (Saldana-Meyer & Recillas-Targa, 2011), Kapitel 1.1.3), aber von diesen wurden nur wenige in einem *Screening* für RBM47-Ziel-mRNAs identifiziert. Zu diesen zählen ETS1 (Rang 229), STAT1 als Teil von ISGF3 (*interferon-stimulated gene factor 3*) (Rang 2177) und RREB1 (*Ras-responsive-element-binding protein 1*) (Rang 2422), die in einer Immunpräzipitation von FLAG-RBM47 in MDA-MB-231-BrM2-Zellen gefunden wurden (Vanharanta et al., 2014). Die mRNAs von STAT1 und RREB1 wurden jedoch nur mit niedriger Abundanz gefunden, was darauf hinweist, dass es sich nur um eine sehr schwache Bindung handelt, die womöglich die Hintergrundbindung nicht übersteigt. ETS1 hingegen wäre ein potentieller Kandidat, der die p53-Transkription RBM47-abhängig kontrollieren könnte, da dieser Transkriptionsfaktor den p53-Promoter bindet (Baillat et al., 2009) und in ETS1-defizienten Zellen die p53 mRNA-Expression reduziert war (Xu et al., 2002). Jedoch wird ETS1 in HCT116-Zellen, welche in dieser Dissertation als Modell genutzt wurden, nicht exprimiert (Suzuki et al., 1995), sodass dieser p53-Transkriptionsfaktor nicht an dem hier beschriebenen Mechanismus beteiligt sein kann.

ISGF3 besteht aus STAT1, STAT2 und IRF-9 (*interferon regulatory factor-9*) und induziert die p53-Transkription nach Stimulation mit Interferonen (IFN) durch Bindung an den p53-Promotor (Takaoka et al., 2003). Nach DNA-Schädigung nimmt auch die Produktion von IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , und - $\lambda$  und die Induktion von IFN-stimulierten Genen zu (Brzostek-Racine et al., 2011; Yu et al., 2015), sodass der ISGF3-Komplex durch ein höheres IFN-Signal zur transkriptionellen Aktivierung von p53 beitragen könnte. Da dieser Komplex auch in HCT116-Zellen exprimiert wird (Kolosenko et al., 2015), wäre es möglich das RBM47 diesen Faktor reguliert. Allerdings nimmt die p53-Transkription nach DNA-Schädigung nur in sehr geringem Maße zu (Abbildung 22A), sodass eine transkriptionelle Aktivierung von p53 nach DNA-Schädigung durch IFN, wenn überhaupt, nur eine geringe Rolle in HCT116-Zellen spielt. Außerdem wurde die Regulation der p53-Transkription durch RBM47 unabhängig von Bestrahlung beobachtet, was darauf hinweist, dass unter diesen Bedingungen eine IFN-vermittelte Induktion der p53-Transkription wahrscheinlich nicht stattfindet, da es ohne schädigenden Stimulus zu keiner Aktivierung von IFN kommt.

Daher ist eine Regulation von STAT1 und damit des ISFG3-Komplexes durch RBM47, die sich auf die basale p53-Transkription auswirkt, nicht anzunehmen.

RREB1 interagiert ebenfalls mit dem p53-Promotor, induziert die Expression von p53 und seinen Zielgenen und hat Einfluss auf das Zellschicksal nach DNA-Schädigung (Liu et al., 2009). Daher ist es vorstellbar, dass RBM47 zur Expression dieses Transkriptionsfaktors auf translationaler Ebene benötigt wird, um eine Transkription von p53 zu ermöglichen. Da die mRNAs von STAT1 und RREB1 allerdings mit einer geringen Abundanz identifiziert wurden, muss zunächst ihre Bindung zu RBM47 überprüft werden. Falls sich diese Bindung verifizieren lässt, muss ihre Bedeutung nach DNA-Schädigung weitergehend analysiert werden. Alternativ zur Untersuchung beschriebener p53-Transkriptionsfaktoren, deren mRNA von RBM47 gebunden wird, könnten weitere Faktoren identifiziert werden, die von RBM47 reguliert werden und durch Bindung an den p53-Promotor die p53-Transkription erhöhen. Dazu wird mittels Luciferase-Promotoraktivitätstests mit immer kürzer werdenden Fragmenten ein genauerer Bereich des p53-Promotors bestimmt, der für die Regulation durch RBM47 benötigt wird. Mit diesem wäre es möglich, in einer IP Proteine zu identifizieren, die nach einer Inkubation mit Zellextrakten an dieses DNA-Stück binden, und deren Bindungsmenge in An- und Abwesenheit von RBM47 zu quantifizieren. Die Expression der so gefundenen Proteine könnte im Anschluss auf eine Regulation durch RBM47 untersucht werden, um festzustellen, ob und auf welche Weise RBM47 diese Faktoren kontrolliert und so die p53-Expression beeinflusst.

Die Veränderung der p53-Expression durch RBM47 hat darüber hinaus Folgen für die Expression der p53-Zielgene und die Regulation des Zellschicksals. So wird RBM47 nicht nur für die Expression von p53 benötigt, sondern in der Konsequenz auch für die transkriptionelle Aktivierung von p21 und PUMA (Abbildung 26). Zwar hatte RBM47 auch in unbehandelten Zellen einen Effekt auf die p53 mRNA-Expression, der jedoch zunächst keine Rolle spielte, da das p53-Protein ohne einen schädigenden Stimulus degradiert wird und kaum detektierbar ist. Wird p53 nach einer DNA-Schädigung post-translational stabilisiert, ist jedoch ohne RBM47 weniger mRNA vorhanden. Es kann nur eine geringere Menge p53-Protein translatiert und auch stabilisiert werden, sodass insgesamt eine verminderte p53-Proteinexpression vorliegt. Die folgende Verringerung der Expression der p53-Zielgene führt zu einer Veränderung des Zellschicksals. In HCT116-Zellen wird nach DNA-Schädigung durch IR normalerweise Seneszenz eingeleitet (Kapitel 3.1), die nach Verringerung von RBM47 jedoch deutlich weniger auftritt. Die Einleitung der Seneszenz ist p53- und p21-abhängig und das Fehlen einer der beiden Proteine in p53- bzw. p21-defizienten Zelllinien führt zu einer erhöhten Apoptoserate (Sohn et al., 2006).

Ein ähnliches Verhalten war auch nach dem *Knockdown* von RBM47 zu beobachten, da die so verringerte p53-Expression zu mehr Apoptose führte (Abbildung 30).

Die Notwendigkeit von RBM47 für die positive Regulierung des p53-p21-Signalwegs und der Seneszenz konnte dabei in verschiedenen Zelllinien aus verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden. Sowohl in Kolon- (Abbildung 22, Abbildung 25, Abbildung 28), als auch in Brust-Adenokarzinom-Zellen und HNSCCs (Abbildung 32, Abbildung 33, Abbildung 34) wurde RBM47 zur Expression der p53 mRNA, Induktion der p53-Zielgene und Einleitung der Seneszenz benötigt. Damit handelt es sich bei der RBM47-vermittelten Regulation um einen generellen Mechanismus, der nicht auf eine Zelllinie oder Tumorentität beschränkt ist.

#### **4.2.2 Im MCF-7-Zellen reguliert RBM47 die p53-Expression zusätzlich post-translational**

In MCF-7-Zellen war nach dem *Knockdown* von RBM47 wie in den HCT116-Zellen und HNSCCs die mRNA-Expression von p53 und seinen Zielgenen verringert, was eine geringere Induktion von Seneszenz zur Folge hatte. Allerdings zeigt sich ein ungewöhnlicher zusätzlicher Einfluss auf die p53-Proteinstabilität, da nur in dieser Zelllinie die p53-Expression durch Verringerung der RBM47-Expression anstieg (Abbildung 32). Da p53-Zielgene wie p21 und PUMA jedoch nicht verstärkt induziert wurden, obwohl mehr p53-Protein vorhanden ist, ist anzunehmen, dass dieses in einer inaktiven Form vorliegt. Interessanterweise hatte RBM47 nur in dieser Zelllinie auch eine Wirkung auf die Expression der p53-Regulatoren HDM2 und HDMX, welche nach der Verringerung von RBM47 anstieg (Abbildung 35). Da HDMX sowohl auf die p53-, als auch auf die HDM2-Proteinexpression einwirkt, könnte eine Zunahme von HDMX die erhöhte Expression von HDM2 und p53 erklären. HDMX hat bezüglich der p53-Expression zwei entgegengesetzte Funktionen. Zum einen wird HDMX als Aktivator von HDM2 für die Degradation von p53 benötigt, da HDM2 allein p53 nur monoubiquitiniert. HDMX stimuliert die Polyubiquitinierung von p53, welche für den Abbau durch das Proteasom benötigt wird (Wang et al., 2011). Allerdings ist HDMX auch selbst ein Substrat von HDM2 (de Graaf et al., 2003; Kawai et al., 2003; Pan & Chen, 2003) und kann in hohen Konzentrationen die Ubiquitinierung von p53 durch HDM2 und damit den p53-Abbau inhibieren (Wang et al., 2011). Dies stimmt mit früheren Beobachtungen überein, dass die Überexpression von HDMX p53 stabilisiert (Sharp et al., 1999; Stad et al., 2001) und dessen transkriptionelle Aktivität supprimieren kann (Jackson & Berberich, 2000). Gleichzeitig nimmt auch die HDM2-Expression zu (Migliorini et al., 2002; Sharp et al., 1999; Stad et al., 2000), da HDMX auch die Auto-Ubiquitylierungsfunktion von HDM2 inhibiert (Stad et al., 2001). Daher wurde postuliert, dass die Regulation der p53-Expression in unbehandelten Zellen,



also ob es zur Degradation des Proteins oder einer Stabilisierung kommt, abhängig von der Ratio von HDMX und HDM2 ist. Liegt das Verhältnis von HDMX zu HDM2 über 2:1, nimmt der p53-Abbau ab (Gu et al., 2002). Allerdings bezog sich dieses Verhältnis auf die Mengen des eingesetzten Plasmids, die für HDMX oder HDM2 kodieren, sodass sich dieser Wert nicht direkt auf die Quantifizierung der Proteinexpression übertragen lässt. Jedoch weist dieser Sachverhalt darauf hin, dass ein optimales Verhältnis von HDM2, HDMX und p53 in der Zelle vorliegen muss, um p53 effektiv zu ubiquitinieren und so für den proteasomalen Abbau zu markieren (Wang et al., 2011). Daher besteht die Möglichkeit, dass durch die veränderte Expression von HDMX und HDM2 nach Verminderung der RBM47-Expression die p53 Proteinexpression erhöht wird, ohne dass das p53-Protein transkriptionell aktiv ist.

Die Ursache für eine modifizierte Expression von HDMX nach Transfektion mit siRNA gegen RBM47 könnte ein verändertes *Splicing*-Muster sein. Wie bereits beschrieben, führt die Überexpression von RBM47 zu einer Exklusion von Exon 6 (Vanharanta et al., 2014), und damit zu einem verkürzten Protein, HDMX-S (Rallapalli et al., 1999). Zwar konnte die Expression der beiden Isoformen im Western Blot nicht detektiert werden, jedoch könnte diese auf mRNA-Ebene mittels spezifischer *Primer* und qPCR-Sonden untersucht werden. Erstaunlicherweise wurde HDMX-S sogar als besserer p53-Inaktivator im Vergleich zu HDMX beschrieben (Rallapalli et al., 2003). Dies spricht jedoch gegen einen Mechanismus, dass das veränderte *Splicing* von HDMX nach der Verringerung der RBM47-Expression zu einer erhöhten p53-Expression führt. Eine Reduktion von HDMX-S nach dem *Knockdown* von RBM47 müsste dann laut Literatur zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität von p53 führen. Da in dieser Arbeit die Menge an p53-Protein zunimmt, aber die transkriptionelle Aktivität verringert bleibt, scheint diese Hypothese nicht korrekt zu sein. Bei der weiteren Analyse der Regulation von HDMX durch RBM47 muss beachtet werden, dass die Veränderung von HDMX auch immer eine Wirkung auf die HDM2- und p53-Proteinexpression und –Aktivität hat (Haupt et al., 2019). Dies könnte auch auf die hier beschriebene Zunahme der p53-Proteinmenge zutreffen und daher die Aufklärung der Regulation von p53 durch RBM47 und den Einfluss von HDMX darauf erschweren.

#### **4.2.3 RBM47 bindet die p21 mRNA 3'UTR-abhängig und verringert ihre Stabilität**

Zusätzlich zum Effekt auf die p53-Expression konnte RBM47 in dieser Arbeit als an p21 mRNA-bindendes Protein identifiziert werden (Abbildung 10). RBM47 verringerte die Stabilität der p21 mRNA in Abhängigkeit von der 3'UTR deutlich (Abbildung 37) und reduzierte so auch die Proteinexpression von FLAG-p21 (Abbildung 38). In weiteren

Studien zur Identifizierung von RBM47-Ziel-mRNAs konnte p21 entweder gar nicht (Sakurai et al., 2016) oder nur mit einer niedrigen Abundanz (Rang 1363) (Vanharanta et al., 2014) detektiert werden. Auch wenn diese Studien den Daten dieser Arbeit zu widersprechen scheinen, sind folgende Tatsachen sehr wahrscheinlich die Ursache für die fehlende Detektion einer Interaktion zwischen RBM47 und der p21 mRNA. So liegt p21 in unbehandelten Zellen nur in sehr geringen Mengen vor, weswegen die mRNA ohne Induktion durch einen Stimulus nur sehr schwer zu identifizieren ist. Da in beiden Studien unbehandelte Zellen verwendet wurden, in denen FLAG-RBM47 überexprimiert wurde, ist es nicht überraschend, dass die p21 mRNA nicht bzw. mit sehr geringer Anreicherung nachgewiesen wurde. Allerdings wurden in beiden Studien auch nur sehr wenige überlappende Ziel-mRNAs von RBM47 identifiziert, was auf die verwendeten Methoden und Zellsysteme zurück zu führen sein könnte. Eine mögliche Ursache sind die unterschiedlichen experimentellen Vorgehensweisen, da zur Identifizierung von Ziel-mRNAs zum einen eine RBM47-RIP (RNA-Immunpräzipitation) mit anschließender Sequenzierung der an RBM47 gebundenen RNAs durchgeführt wurde (Sakurai et al., 2016). Zum anderen wurde nach Überexpression von RBM47 eine HITS-CLIP (*High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation*)-Analyse verwendet (Vanharanta et al., 2014). Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Dissertationsarbeit eine IP der p21 mRNA vorgenommen und die präzipitierte mRNA auf daran gebundene RNA-bindende Proteine analysiert. Da die p21 mRNA *in vitro* synthetisiert und dann mit Extrakten aus HCT116-Zellen inkubiert wurde, war eine geringe Expression der p21 mRNA kein limitierender Faktor mehr, sodass RBPs unabhängig von der endogenen p21 mRNA-Menge identifiziert werden konnten. Auf der anderen Seite könnte die Identifizierung unterschiedlicher RBM47-Ziel-mRNAs auch zeigen, dass RBM47 vielseitige Funktionen besitzt, sodass es viele verschiedene mRNAs binden kann, um damit zahlreiche diverse Vorgänge zu beeinflussen. Ein weiterer Hinweis auf die Vielseitigkeit von RBM47 scheint auch das Fehlen einer eindeutigen Bindesequenz zu sein, denn bisher wurden drei unterschiedliche putative Sequenzen identifiziert (Kim et al., 2019; Ray et al., 2013; Vanharanta et al., 2014). Zwar kann diese Diskrepanz ebenfalls auf methodische Ursachen zurück zu führen sein, da zum einen humanes RBM47 und humane Zellen (Kim et al., 2019; Vanharanta et al., 2014), aber auch RBM47 aus Huhn (*Gallus gallus*) und Frosch (*Xenopus tropicalis*) (Ray et al., 2013) verwendet wurden. Allerdings stimmen auch die beiden Sequenzen, die in humanen Systemen beschrieben wurden, nicht überein. Die (U)GCAUG-Sequenz wurde in mRNAs gefunden, die während der epithelialen-mesenchymalen Transition von alternativem *Splicing* durch RBM47 betroffen waren (Kim et al., 2019). Die vage Poly-U-Sequenz wurde in einem großen, nicht-zielgerichteten Screening identifiziert, in dem ebenfalls Alternatives *Splicing*, aber

auch die Regulation der mRNA-Stabilität durch RBM47 beschrieben wurde (Vanharanta et al., 2014). Obwohl die Autoren die Ursache für den Mangel einer genauen Bindesequenz in der breitgefächerten Fähigkeit, mRNAs zu binden, begründet sehen, konnte der Grund für die verschiedenen beschriebenen Bindesequenzen bisher nicht aufgeklärt werden.

Auf Grund der 3'UTR-abhängigen Bindung verringerte RBM47 die Stabilität der p21 mRNA und damit auch die Expression eines FLAG-p21-Konstruktes in Anwesenheit der 3'UTR. Damit war dieser direkte translationale Mechanismus entgegengesetzt zur indirekten p53-vermittelten transkriptionellen Regulation von p21 durch RBM47, bei der RBM47 zur Expression von p21 nach einer DNA-Schädigung benötigt wurde. Die durch RBM47 verringerte Stabilität der p21 mRNA hatte dadurch im untersuchten Zellsystem keine Auswirkungen, da die Zunahme der p53 mRNA-Expression durch RBM47 dominant wirkte und so zu mehr p21 mRNA-Transkription führte, auch wenn diese dann instabiler ist. Dennoch könnte RBM47 durch diese entgegengesetzte Regulation, eventuell in anderen Zellsystemen oder in anderen Signalwegen, eine Rolle in der Feinabstimmung der p21-Expression spielen. Außerdem ist es denkbar, dass die direkte translationale Regulation der p21-Expression durch RBM47 in Signalwegen eine Rolle spielt, in denen p21 unabhängig von p53 aktiviert wird, wie z.B. durch verschiedene Tumorsuppressoren wie das Brustkrebsgen 1 (BRCA1) oder Onkogene wie c-Myc (Warfel & El-Deiry, 2013). BRCA1 ist ein Tumorsuppressor, der Funktionen in der DNA-Reparatur und in der Steuerung von Zellzyklus-Checkpoints besitzt, und dessen Funktionsverlust in Kombination mit anderen geschädigten DDR-Mediatoren zur Tumorentwicklung, vor allem zur Entstehung von Brustkrebs, beitragen kann (Roy et al., 2011). Bei Überexpression induziert BRCA1 die Expression von p21 transkriptionell unabhängig von p53 und verhindert damit den Übergang in die S<sub>1</sub>-Phase (Somasundaram et al., 1997). So könnte RBM47 die p21-Expression nach dessen Induktion durch BRCA1 über die Modulation der p21 mRNA-Stabilität wieder inhibieren und so über das zelluläre Schicksal mitbestimmen. Interessanterweise wurde RBM47 in der Brustkrebsentwicklung als Tumorsuppressor klassifiziert, dessen Verlust zu einer Progression des Tumorwachstums und der Metastase führte (Vanharanta et al., 2014). Allerdings sollte RBM47 durch die Verringerung der p21-Expression vermutlich einen Proliferations-fördernden Effekt auf Zellen ausüben, da die Verringerung der p21-Aktivität tendenziell die Zellprogression verstärkt (Abbas & Dutta, 2009). Daher ist nicht anzunehmen, dass RBM47 in seiner Funktion als Tumorsuppressor die Aktivität von BRCA1 im Bezug auf p21 unterstützt. Dennoch könnte RBM47 die Expression von p21 nach der Induktion durch BRCA1 beeinflussen.

Das Onkogen c-Myc, welches durch Überexpression zur Entstehung von 40% der Tumorerkrankungen beiträgt (Miller et al., 2012), kann im Gegensatz zu BRCA1 die Transkription von p21 reprimieren. Dies erreicht c-Myc zum einen durch Bindung der DNA-bindenden Domäne des p21-Transkriptionsfaktors SP1, wodurch die Transaktivierung von p21 verhindert wird (Gartel et al., 2001). Zum anderen fördert c-Myc die Expression von AP4 direkt, welcher durch Bindung an den p21-Promotor die Transkription verhindert (Jung et al., 2008). In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, dass RBM47 die p21-Expression durch Reduktion der mRNA-Stabilität weiter verringert und so zum tumorfördernden Effekt von c-Myc beiträgt. Daran wird deutlich, dass RBM47 durch seine inhibierende Wirkung auf p21 einen onkogenen Effekt besitzt. Bisher wurde RBM47 in der Literatur als Tumorsuppressor klassifiziert und als negativer Regulator von Metastasierung beschrieben (Rokavec et al., 2017; Sakurai et al., 2016; Vanharanta et al., 2014). Auch der in dieser Arbeit identifizierte aktivierende Mechanismus auf die p53-Expression könnte Tumorbildungen entgegenwirken. Daher besteht die Möglichkeit, dass RBM47 Kontext-abhängig ein Tumorsuppressor sein kann, der z.B. durch Aufrechterhaltung von epithelialen *Splicing*-Mustern Metastasierung verhindert (Cieply et al., 2016), oder durch die Stabilisierung der mRNA von Tumorsuppressoren deren Expression fördert (Vanharanta et al., 2014). Aber durch die Verringerung der p21-Expression besitzt RBM47 auch einen proliferationsfördernden und damit potentiell onkogenen Effekt, da das Zellzyklus-inhibierende Potential reduziert ist. Um festzustellen, ob RBM47 in Bezug auf die p21-Expression eine tumorsuppressive oder tumorfördernde Funktion besitzt, muss daher die Wirkung der p21-Inhibition durch RBM47 im zellulären Kontext sehr genau analysiert werden.

Ein weiterer Faktor, der p21 unabhängig von p53 aktiviert und einen Zellzyklus-Arrest einleitet, ist TGF- $\beta$  (Datto et al., 1995a). Der p21-Promotor besitzt ein TGF- $\beta$ -*responsive Element*, welches eine Bindestelle des Transkriptionsfaktors SP1 besitzt (Datto et al., 1995b). Dieser interagiert nach der Stimulation mit TGF- $\beta$  mit Proteinen der SMAD-Familie, was zur Aktivierung von p21 führt (Moustakas & Kardassis, 1998). Die Expression von p21 nach der Behandlung mit TGF- $\beta$  ging mit der Ausprägung von Seneszenz in Leber- und Lungenkarzinom-Zellen (Katakura et al., 1999; Senturk et al., 2010), bronchialen Epithel-Zellen (Minagawa et al., 2011) und dermalen Fibroblasten (Debacq-Chainiaux et al., 2005) einher. Ein Auslöser für die Freisetzung von TGF- $\beta$ , der zum Eintritt in die Seneszenz führte, war beispielsweise subzytotoxischer oxidativer Stress durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Frippiat et al., 2001). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit TGF- $\beta$  zu einer Repression von RBM47 (in murinen Zellen der Brustdrüse) und der *Knockdown* von RBM47 in A549-Zellen zu einer Zunahme der p21-mRNA Expression führt (Sakurai et al., 2016). Diese publizierte Beobachtung der

Stabilisierung der p21 mRNA durch RBM47 stimmt mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit überein. Daher ist es nahe liegend, dass TGF- $\beta$  nicht nur die Transkription von p21 reguliert, sondern auch über die Repression von RBM47 einen weiteren positiven Effekt auf post-transkriptioneller Ebene auf die p21-Expression hat. Allerdings konnte in dieser Publikation keine Bindung von RBM47 an die p21 mRNA nachgewiesen werden (Sakurai et al., 2016). Die Reduktion der RBM47-Expression durch TGF- $\beta$  wurde darüber hinaus in einem EMT-Modell beschrieben (Kim et al., 2019), was zum einen die Bedeutung von TGF- $\beta$  in der Regulation von RBM47 bestätigt. Außerdem unterstreicht diese Beobachtung, dass RBM47 einen positiven Effekt auf die Tumorsuppression besitzt. TGF- $\beta$  wurde darüber hinaus kürzlich als wichtiger Faktor in der p53-unabhängigen embryonalen Entwicklungsseneszenz beschrieben (Munoz-Espin et al., 2013). Diese Form der Seneszenz ist ein physiologischer Prozess in verschiedenen embryonalen Geweben wie z.B. des Neuralrohrs (Munoz-Espin et al., 2013; Storer et al., 2013), der Gewebe-Remodulierungen während der Embryonalentwicklung ermöglicht. Dafür ist die Expression von p21 essentiell, die unabhängig von einer DNA-Schädigung und einer p53-Expression bzw. Aktivierung auftritt und stattdessen von den Transkriptionsfaktoren SMAD und FOXO reguliert wird (Munoz-Espin et al., 2013). Diese Proteine werden durch TGF- $\beta$  bzw. durch die Inhibition des Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)/Akt-Signalwegs aktiviert und bilden zusammen einen Komplex, der die p21-Transkription induziert (Seoane et al., 2004). RBM47 wird während der embryonalen Entwicklung exprimiert und ein Fehlen von RBM47 löst schwere embryonale Fehlbildungen, vor allem des Kopfes, in der Zebrafiscentwicklung aus und führt zu einer hohen Letalitätsrate von Mausembryonen während der Gestation (Fossat et al., 2016; Guan et al., 2013). Daher könnte eine Veränderung der Expression von RBM47 durch TGF- $\beta$  einen Einfluss auf die Expression von p21 und damit einen Einfluss auf die Ausprägung der Seneszenz und deren zeitlicher Steuerung in der Embryonalentwicklung haben.

Die Aufklärung des Mechanismus, in welchen Systemen RBM47 die Expression von p21 beeinflusst, wird durch die Tatsache erschwert, dass p53 in dieser Arbeit auch für die Regulation der p21 mRNA-Stabilität durch RBM47 benötigt wurde. Denn eine Veränderung konnte nach einer Reduktion der RBM47-Expression nur in Anwesenheit von p53 festgestellt werden. Die Notwendigkeit von p53 in der post-transkriptionellen Steuerung von p21 wurde auch bei einem weiteren p21-RBP, DDX41 (DEAD-box Helicase 41), welches als translationaler Repressor der p21 mRNA-Expression fungiert, beobachtet. So wurde p53 in HCT116-Zellen nicht nur für die transkriptionelle Aktivierung von p21 benötigt, sondern auch für die translationale Repression durch DDX41 (Peters et al., 2017). Da in vorherigen Studien postuliert wurde, dass p53 direkt mRNAs bindet (Riley & Maher, 2007) und somit als Ko-Faktor von RBPs wie z.B. DDX41 (und RBM47)



dienen könnte, wäre dies ein möglicher Wirkmechanismus. Allerdings konnte p53 nicht als p21 mRNA-RBP identifiziert werden (Peters et al., 2017). Darüber hinaus ist es möglich, dass p53 bisher unbekannte Faktoren koordiniert, die für die Translation allgemein, für die Translation einer bestimmten Gruppe von mRNAs oder auch nur von p21 benötigt werden, und daher in Abwesenheit von p53 anders exprimiert werden (Peters et al., 2017). Daher besteht die Möglichkeit, dass p53 verschiedene Faktoren beeinflusst, die für die Regulation der mRNA-Stabilität verantwortlich sind, wie beispielsweise die RBPs RBM24, PCBP4 und RBM38, die alle von p53 aktiviert werden und die p21 mRNA kontrollieren (Jiang et al., 2014; Scoumanne et al., 2011; Shu et al., 2006). Des Weiteren ist es denkbar, dass diese Faktoren mit RBM47 interagieren und die p21-Expression auf translationaler Ebene gemeinschaftlich kontrollieren. Sowohl RBM24 als auch RBM38 erhöhen die Stabilität der p21 mRNA (Jiang et al., 2014; Shu et al., 2006); im Gegenteil dazu verringerte RBM47 die Stabilität. Daher ist nach aktuellem Wissenstand nicht anzunehmen, dass RBM47 mit einem der beiden Proteine die p21 mRNA-Expression gemeinschaftlich reguliert, da eine gemeinsame Bindung von RBM47 mit einem dieser RBPs an die p21 mRNA den jeweiligen Effekt eher neutralisieren würde. In der Annahme, dass ihre Expression auf Grund der fehlenden p53-Expression im Vergleich zu p53-Wildtyp-Zellen reduziert ist, müsste dies sogar den destabilisierenden Effekt durch RBM47 verstärken, da eine stabilisierende Komponente fehlt. Im Gegensatz dazu verringert PCBP4 wie RBM47 die Stabilität der p21 mRNA (Shu et al., 2006). Daher könnten PCBP4 und RBM47 interagieren, und so die p21-Expression gemeinschaftlich beeinflussen. Die Abwesenheit von p53 würde dann zu einer geringeren PCBP4-Expression führen, sodass eine Regulation der p21 mRNA durch PCBP4 nicht mehr stattfindet. In der Annahme, dass RBM47 PCBP4 benötigt, um einen Effekt auf die p21 mRNA-Stabilität zu haben, kann RBM47 die p21 mRNA-Stabilität in Abwesenheit von PCBP4 nicht verändern. Dies würde erklären, dass RBM47 in Abwesenheit von p53 keinen Einfluss auf die p21 mRNA-Stabilität aufwies (Abbildung 37). Um aufzuklären, ob eine gemeinschaftliche Steuerung durch RBM47 und PCBP4 vorliegt, wäre es z.B. denkbar, zunächst zu untersuchen, ob die PCBP4-Expression in HCT116-Zellen durch Abwesenheit von p53 verändert wird. Nimmt die Expression dieses RBPs wie in der Literatur beschrieben ab, könnte durch eine Ko-Immunpräzipitation überprüft werden, ob RBM47 und PCBP4 interagieren. Die Notwendigkeit von PCBP4 für die p21 mRNA-Stabilität im Zusammenspiel mit RBM47 könnte darüber hinaus durch einen *Knockdown* von PCBP4 mit RBM47 in p53-Wildtyp-Zellen analysiert werden. Hat der *Knockdown* von RBM47 in Abwesenheit von PCBP4 keinen Effekt, ist anzunehmen, dass RBM47 PCBP4 für die p21 mRNA-Regulation benötigt. Da der Einfluss von p53 auf die p21-Expression durch RBM47 einen weiteren interessanten Mechanismus darstellt, der die Expression

von p21 beeinflusst, ist es unerlässlich, die Beobachtungen zur p21 mRNA-Stabilität und die Abhängigkeit von p53 in anderen Zelllinien nach DNA-Schädigung zu überprüfen.

### **4.3 Schlussfolgerung**

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das RNA-bindende Protein RBM47 über die Regulierung des p53-p21-Signalwegs die Zellschicksalsentscheidung nach DNA-Schäden beeinflusst. So kontrolliert RBM47 durch mindestens zwei entgegengesetzte agierende Mechanismen die Expression von p53 und p21. Zum einen wird RBM47 für die Transkription von p53 benötigt, wobei das RBP auf Grund einer fehlenden DNA-Bindungsfähigkeit nach aktuellen Daten die p53-Expression indirekt über die Regulation eines p53-aktivierenden oder -inhibierenden Transkriptionsfaktors kontrolliert. Diese positive Wirkung auf die p53-Expression wird für die Induktion der p53-Zielgene und die Ausprägung der Seneszenz nach DNA-Schädigung in verschiedenen Tumorentitäten benötigt. Zum anderen übt RBM47 über die Bindung an die 3'UTR einen direkten negativen Effekt auf die p21 mRNA-Stabilität aus, der jedoch im verwendeten System der starken Wirkung auf die p53-Expression überdeckt wird. Daher ist dieser Mechanismus vermutlich überwiegend in p53-unabhängigen Aktivierungswegen von p21, wie z.B. durch TGF- $\beta$  in der embryonalen Entwicklungsseneszenz, von Bedeutung. Darüber hinaus übt RBM47 einen post-translationalen Effekt auf die p53-Expression in MCF-7-Zellen aus, der mit einer Veränderung der Expression der p53-Regulatoren HDMX und HDM2 einhergeht. Anhand dieser Beobachtungen konnte erstmalig die Bedeutung von RBM47 in stressinduzierten Signalwegen gezeigt werden.

## 5. Zusammenfassung

### Zusammenfassung

Die translationale Regulation der Genexpression, z.B. durch RNA-bindende Proteine (RBPs), ist von großer Bedeutung für viele zelluläre Signalwege. Nach DNA-Schädigungen wird der p53-p21-Signalweg aktiviert, welcher einen wichtigen Regulator des Zellschicksals darstellt. In dieser Arbeit wurde der Einfluss des kürzlich-identifizierten RBPs RBM47, welches als Tumorsuppressor die Progression von Brust- und Kolonkrebs inhibiert, auf den p53-p21-Signalweg analysiert. Um die Rolle von RBM47 in der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-vermittelten p21-Expression zu untersuchen, wurde zunächst überprüft, auf welcher Ebene die MAPK ERK, JNK und p38 die p21-Expression nach DNA-Schädigung regulieren. Während dies im Fall von JNK nicht genau geklärt werden konnte, reguliert ERK die Expression von p21 auf post-translationaler und p38 auf translationaler Ebene. Obwohl diese Beobachtung p38 als potentiellen Kandidaten ausweist, der eine RBM47-abhängige p21-Regulation beeinflusst, wurde dieser Signalweg auf Grund parallel erhaltener Ergebnisse nicht weiter untersucht. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass RBM47 den p53-p21-Signalweg auf verschiedenen Ebenen reguliert. RBM47 wird für die basale und DNA-schädigungsinduzierte Expression von p53 und p21 in verschiedenen Tumorentitäten benötigt. Die Reduktion der RBM47-Proteinexpression führte zu einer Abnahme der p53 mRNA- und Proteinexpression, was auf eine verringerte p53-Promotoraktivität zurück zu führen war. Durch die veränderte p53-Proteinexpression nahm auch die p21-Expression nach dem *Knockdown* von RBM47 auf transkriptioneller Ebene ab. Auf Grund des Einflusses auf p53 und seine Zielgene reguliert RBM47 das Zellschicksal, und wird für die Einleitung der Seneszenz benötigt. In MCF-7-Zellen übt RBM47 zusätzlich einen post-translationalen Effekt auf die p53-Expression aus, der vermutlich über die p53-Regulatoren HDMX und HMD2 vermittelt wird. Die Reduktion der RBM47-Expression führte zwar zu einer Zunahme der p53-Proteinstabilität, wobei dieser Tumorsuppressor jedoch inaktiv zu sein schien, da es zu keiner Zunahme der Transkription von p53-Zielelenen kam. Interessanterweise inhibiert RBM47 auch die p21-Proteinexpression, in dem es die p21 mRNA 3'UTR-abhängig bindet und so die Stabilität der mRNA verringert. Jedoch scheint dieser Mechanismus im verwendeten HCT116-Zellsystem auf Grund der indirekten transkriptionellen Aktivierung von p53 keine Bedeutung für die p21-Expression nach DNA-Schädigung zu haben. Dieser Effekt könnte jedoch eine wichtige Rolle in p53-unabhängigen p21-Aktivierungswegen, wie z.B. in der embryonalen Entwicklungsseneszenz, spielen und darüber hinaus auf Grund der potentiellen zellzyklus-fördernden Wirkung auch onkogene Funktionen vermitteln. Damit wurde RBM47 in dieser Arbeit als wichtiger Regulator des

Zellschicksals beschrieben, der den p53-p21-Signalweg auf verschiedenen Ebenen reguliert.

### **Abstract**

Translational regulation of gene expression, e.g. by RNA-binding proteins (RBPs), is of major importance for most cellular signaling pathways. One of these is the p53-p21-signaling pathway that regulates cell fate upon DNA damage. In this thesis the role of the newly-identified RBP and tumoursuppressor RBM47, which inhibits the progression of breast- and colon carcinoma, was analyzed with regards to its role in the aforementioned signaling pathway. To identify if this RBP is involved in mitogen activated protein kinase (MAPK)-mediated p21-expression after DNA-damage, the regulation of p21 expression by the MAPKs ERK, JNK and p38 was evaluated first. While it could not be determined at which level JNK controls p21, ERK was shown to coordinate the p21 expression at the post-translational and p38 at the translational level. Although this result indicated that p38 may regulate RBPs like RBM47 to control p21 expression, due to results obtained in parallel studies, the role of RBM47 in p38-mediated p21-expression was not further evaluated. Instead, it could be demonstrated that the p53-p21-axis is regulated by RBM47 at different levels. RBM47 is required for DNA-damage-induced expression of p53 and p21 in different tumor entities. The knockdown of RBM47 resulted in a reduction of p53 mRNA and protein expression because of a decreased p53 promoter activity. This resulted in a diminished p21 transcription and subsequently into a reduced onset of senescence and increased apoptosis after DNA-damage. RBM47 also had a post-translational effect on p53 expression only in MCF-7 cells that might be caused by the p53 regulators HDMX and HDM2 that were also affected by RBM47. Although the protein stability of p53 was increased following knockdown of RBM47, the transcription factor appeared to be inactive as there was no elevated induction of p53 target genes observed. Additionally, RBM47 was found to bind to the p21 mRNA in a 3'UTR-dependent manner, thereby decreasing the stability of this transcript which resulted in a decreased FLAG-p21 protein expression. However, this regulation was not sufficient to overcome the p53-dependent p21 protein production in the HCT116 cellular system used in this study. Therefore, this regulation that most likely fine-tunes p21 expression may have an important role in p53-independent p21 activations pathways, e.g. in developmental senescence. In addition, RBM47 may also act as a pro-tumorigenic factor as the decrease in p21 exerts a rather promoting effect on cell proliferation. Nevertheless, the present study has clearly identified RBM47 as an important regulator of DNA damage-induced cell fate decisions by controlling the p53-p21-signaling pathway.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abbas, T. & Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, **9**(6), 400-14.
- Abdelmohsen, K., Tominaga, K., Lee, E.K., Srikantan, S., Kang, M.J., Kim, M.M., Selimyan, R., Martindale, J.L., Yang, X., Carrier, F., Zhan, M., Becker, K.G. & Gorospe, M. (2011). Enhanced translation by Nucleolin via G-rich elements in coding and non-coding regions of target mRNAs. *Nucleic Acids Res*, **39**(19), 8513-30.
- Adachi, S., Homoto, M., Tanaka, R., Hioki, Y., Murakami, H., Suga, H., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Hatta, T., Iemura, S. & Natsume, T. (2014). ZFP36L1 and ZFP36L2 control LDLR mRNA stability via the ERK-RSK pathway. *Nucleic Acids Res*, **42**(15), 10037-49.
- Ahuja, D., Goyal, A. & Ray, P.S. (2016). Interplay between RNA-binding protein HuR and microRNA-125b regulates p53 mRNA translation in response to genotoxic stress. *RNA Biol*, **13**(11), 1152-65.
- Amagasaki, K., Kaneto, H., Heldin, C.H. & Lennartsson, J. (2006). c-Jun N-terminal kinase is necessary for platelet-derived growth factor-mediated chemotaxis in primary fibroblasts. *J Biol Chem*, **281**(31), 22173-9.
- Asada, M., Yamada, T., Ichijo, H., Delia, D., Miyazono, K., Fukumuro, K. & Mizutani, S. (1999). Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21<sup>Cip1/WAF1</sup> in monocytic differentiation. *The EMBO Journal*, **18**(5), 1223-34.
- Baillat, D., Laitem, C., Leprivier, G., Margerin, C. & Aumercier, M. (2009). Ets-1 binds cooperatively to the palindromic Ets-binding sites in the p53 promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, **378**(2), 213-7.
- Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., van Tuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y., White, R. & Vogelstein, B. (1989). Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, **244**(4901), 217-21.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S.-Y., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y. & Ziv, Y. (1998). Enhanced Phosphorylation of p53 by ATM in Response to DNA Damage. *Science*, **281**(5383), 1674-7.
- Bargonetti, J., Friedman, P.N., Kern, S.E., Vogelstein, B. & Prives, C. (1991). Wild-type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequences adjacent to the SV40 origin of replication. *Cell*, **65**(6), 1083-91.
- Barnum, K.J. & O'Connell, M.J. (2014). Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol Biol*, **1170**, 29-40.
- Battelli, C., Nikopoulos, G.N., Mitchell, J.G. & Verdi, J.M. (2006). The RNA-binding protein Musashi-1 regulates neural development through the translational repression of p21<sup>WAF-1</sup>. *Mol Cell Neurosci*, **31**(1), 85-96.
- Baus, F., Gire, V., Fisher, D., Piette, J. & Dulić, V. (2003). Permanent cell cycle exit in G2 phase after DNA damage in normal human fibroblasts. *EMBO J*, **22**(15), 3992-4002.
- Bennett, B.L., Sasaki, D.T., Murray, B.W., O'Leary, E.C., Sakata, S.T., Xu, W., Leisten, J.C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S.S., Manning, A.M. & Anderson, D.W. (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(24), 13681-6.



- Biegging, K.T. & Attardi, L.D. (2012). Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression. *Trends Cell Biol*, **22**(2), 97-106.
- Blanc, V. & Davidson, N.O. (2003). C-to-U RNA editing: mechanisms leading to genetic diversity. *J Biol Chem*, **278**(3), 1395-8.
- Blanc, V., Xie, Y., Kennedy, S., Riordan, J.D., Rubin, D.C., Madison, B.B., Mills, J.C., Nadeau, J.H. & Davidson, N.O. (2019). APOBEC1 complementation factor (A1CF) and RBM47 interact in tissue-specific regulation of C to U RNA editing in mouse intestine and liver. *RNA*, **25**(1), 70-81.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S. & Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, **279**(5349), 349-52.
- Bradford, C.R., Zhu, S., Ogawa, H., Ogawa, T., Ubell, M., Narayan, A., Johnson, G., Wolf, G.T., Fisher, S.G. & Carey, T.E. (2003). P53 mutation correlates with cisplatin sensitivity in head and neck squamous cell carcinoma lines. *Head Neck*, **25**(8), 654-61.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**(1-2), 248-54.
- Brenner, J.C., Graham, M.P., Kumar, B., Saunders, L.M., Kupfer, R., Lyons, R.H., Bradford, C.R. & Carey, T.E. (2010). Genotyping of 73 UM-SCC head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Head Neck*, **32**(4), 417-26.
- Briata, P., Forcales, S.V., Ponassi, M., Corte, G., Chen, C.Y., Karin, M., Puri, P.L. & Gherzi, R. (2005). p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts. *Mol Cell*, **20**(6), 891-903.
- Brzostek-Racine, S., Gordon, C., Van Scoy, S. & Reich, N.C. (2011). The DNA damage response induces IFN. *J Immunol*, **187**(10), 5336-45.
- Budinska, E., Popovici, V., Tejpar, S., D'Ario, G., Lapique, N., Sikora, K.O., Di Narzo, A.F., Yan, P., Hodgson, J.G., Weinrich, S., Bosman, F., Roth, A. & Delorenzi, M. (2013). Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. *J Pathol*, **231**(1), 63-76.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to Sustain G<sub>2</sub> Arrest After DNA Damage. *Science*, **282**(5393), 1497-501.
- Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*, **75**, 685-705.
- Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**(9), 729-40.
- Cargnello, M. & Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, **75**(1), 50-83.
- Chatterji, P. & Rustgi, A.K. (2018). RNA Binding Proteins in Intestinal Epithelial Biology and Colorectal Cancer. *Trends Mol Med*, **24**(5), 490-506.
- Chen, C.Y., Gherzi, R., Andersen, J.S., Gaietta, G., Jürchott, K., Royer, H.D., Mann, M. & Karin, M. (2000). Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes Dev*, **14**(10), 1236-48.
- Chen, C.Y. & Shyu, A.B. (1995). AU-rich Elements: Characterization and Importance in mRNA Degradation. *Trends Biochem Sci*, **20**(11), 465-70.

- Chen, J., Guo, K. & Kastan, M.B. (2012). Interactions of nucleolin and ribosomal protein L26 (RPL26) in translational control of human p53 mRNA. *J Biol Chem*, **287**(20), 16467-76.
- Chen, L., Gilkes, D.M., Pan, Y., Lane, W.S. & Chen, J. (2005). ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage. *EMBO J*, **24**(19), 3411-22.
- Child, E.S. & Mann, D.J. (2006). The Intricacies of p21 Phosphorylation: Protein/Protein Interactions, Subcellular Localization and Stability. *Cell Cycle*, **5**(12), 1313-9.
- Childs, B.G., Baker, D.J., Kirkland, J.L., Campisi, J. & van Deursen, J.M. (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep*, **15**(11), 1139-53.
- Childs, B.G., Durik, M., Baker, D.J. & van Deursen, J.M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med*, **21**(12), 1424-35.
- Cho, S.J., Zhang, J. & Chen, X. (2010). RNPC1 modulates the RNA-binding activity of, and cooperates with, HuR to regulate p21 mRNA stability. *Nucleic Acids Res*, **38**(7), 2256-67.
- Ciccarelli, C., Marampon, F., Scoglio, A., Mauro, A., Giacinti, C., De Cesaris, P. & Zani, B.M. (2005). p21<sup>WAF1</sup> expression induced by MEK/ERK pathway activation or inhibition correlates with growth arrest, myogenic differentiation and onco-phenotype reversal in rhabdomyosarcoma cells. *Mol Cancer*, **4**, 41.
- Cieply, B., Park, J.W., Nakauka-Ddamba, A., Bebee, T.W., Guo, Y., Shang, X., Lengner, C.J., Xing, Y. & Carstens, R.P. (2016). Multiphasic and Dynamic Changes in Alternative Splicing during Induction of Pluripotency Are Coordinated by Numerous RNA-Binding Proteins. *Cell Rep*, **15**(2), 247-55.
- Coleman, M.L., Densham, R.M., Croft, D.R. & Olson, M.F. (2006). Stability of p21<sup>Waf1/Cip1</sup> CDK inhibitor protein is responsive to RhoA-mediated regulation of the actin cytoskeleton. *Oncogene*, **25**(19), 2708-16.
- Coleman, M.L., Marshall, C.J. & Olson, M.F. (2003). Ras promotes p21<sup>Waf1/Cip1</sup> protein stability via a cyclin D1-imposed block in proteasome-mediated degradation. *EMBO J*, **22**(9), 2036-46.
- Collado, M. & Serrano, M. (2006). The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer*, **6**(6), 472-6.
- Coppe, J.P., Desprez, P.Y., Krtolica, A. & Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*, **5**, 99-118.
- Coppin, L., Leclerc, J., Vincent, A., Porchet, N. & Pigny, P. (2018). Messenger RNA Life-Cycle in Cancer Cells: Emerging Role of Conventional and Non-Conventional RNA-Binding Proteins? *Int J Mol Sci*, **19**(3), 650.
- Crowley, L.C., Scott, A.P., Marfell, B.J., Boughaba, J.A., Chojnowski, G. & Waterhouse, N.J. (2016). Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*, **2016**(7).
- Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y.N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T.F., Young, P.R. & Lee, J.C. (1995). SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett*, **364**(2), 229-33.
- Cuenda, A. & Rousseau, S. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta*, **1773**(8), 1358-75.

- Cui, X., Zhang, J., Ma, P., Myers, D.E., Goldberg, I.G., Sittler, K.J., Barb, J.J., Munson, P.J., Cintron Adel, P., McCoy, J.P., Wang, S. & Danner, R.L. (2005). cGMP-independent nitric oxide signaling and regulation of the cell cycle. *BMC Genomics*, **6**, 151.
- Curtin, N.J. (2012). DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer*, **12**(12), 801-17.
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A. & Adams, J.M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **15**(1), 49-63.
- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P. & Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, **426**(6963), 194-8.
- Datto, M.B., Li, Y., Panus, J.F., Howe, D.J., Xiong, Y. & Wang, X.F. (1995a). Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(12), 5545-9.
- Datto, M.B., Yu, Y. & Wang, X.F. (1995b). Functional analysis of the transforming growth factor beta responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J Biol Chem*, **270**(48), 28623-8.
- Davis, R.J. (2000). Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Cell*, **103**(2), 239-52.
- de Graaf, P., Little, N.A., Ramos, Y.F., Meulmeester, E., Letteboer, S.J. & Jochemsen, A.G. (2003). Hdmx protein stability is regulated by the ubiquitin ligase activity of Mdm2. *J Biol Chem*, **278**(40), 38315-24.
- de Oca Luna, R.M., Wagner, D.S. & Lozano, G. (1995). Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature*, **378**(6553), 203-6.
- Dean, J.L., Brook, M., Clark, A.R. & Saklatvala, J. (1999). p38 mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J Biol Chem*, **274**(1), 264-9.
- Dean, J.L., Sully, G., Clark, A.R. & Saklatvala, J. (2004). The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cell Signal*, **16**(10), 1113-21.
- Debacq-Chainiaux, F., Borlon, C., Pascal, T., Royer, V., Eliaers, F., Ninane, N., Carrard, G., Friguet, B., de Longueville, F., Boffe, S., Remacle, J. & Toussaint, O. (2005). Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J Cell Sci*, **118**(Pt 4), 743-58.
- Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J.D., Campisi, J. & Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*, **4**(12), 1798-806.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O. & Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, **26**(22), 3279-90.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubeli, I., Pereira-Smith, O.M., Peacocke, M. & Campisi, J. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(20), 9363-7.
- Dulić, V., Stein, G.H., Far, D.F. & Reed, S.I. (1998). Nuclear accumulation of p21<sup>Cip1</sup> at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol Cell Biol*, **18**(1), 546-57.

- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, **75**(4), 817-25.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, **35**(4), 495-516.
- Essmann, F., Engels, I.H., Totzke, G., Schulze-Osthoff, K. & Jänicke, R.U. (2004). Apoptosis resistance of MCF-7 breast carcinoma cells to ionizing radiation is independent of p53 and cell cycle control but caused by the lack of caspase-3 and a caffeine-inhibitable event. *Cancer Res*, **64**(19), 7065-72.
- Essmann, F., Pohlmann, S., Gillissen, B., Daniel, P.T., Schulze-Osthoff, K. & Jänicke, R.U. (2005). Irradiation-induced translocation of p53 to mitochondria in the absence of apoptosis. *J Biol Chem*, **280**(44), 37169-77.
- Farmer, G., Bargonetti, J., Zhu, H., Friedman, P., Prywes, R. & Prives, C. (1992). Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature*, **358**(6381), 83-6.
- Favata, M.F., Horiuchi, K.Y., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Feeser, W.S., Van Dyk, D.E., Pitts, W.J., Earl, R.A., Hobbs, F., Copeland, R.A., Magolda, R.L., Scherle, P.A. & Trazakos, J.M. (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*, **273**(29), 18623-32.
- Finlay, C.A., Hinds, P.W. & Levine, A.J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*, **57**(7), 1083-93.
- Fischer, M. (2017). Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*, **36**(28), 3943-56.
- Fischer, M., Grossmann, P., Padi, M. & DeCaprio, J.A. (2016). Integration of TP53, DREAM, MMB-FOXM1 and RB-E2F target gene analyses identifies cell cycle gene regulatory networks. *Nucleic Acids Res*, **44**(13), 6070-86.
- Fischer, M., Steiner, L. & Engeland, K. (2014). The transcription factor p53: not a repressor, solely an activator. *Cell Cycle*, **13**(19), 3037-58.
- Flores-Rozas, H., Kelman, Z., Dean, F.B., Pan, Z.Q., Harper, J.W., Elledge, S.J., O'Donnell, M. & Hurwitz, J. (1994). Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(18), 8655-9.
- Fontana, L., Fiori, M.E., Albini, S., Cifaldi, L., Giovinnazzi, S., Forloni, M., Boldrini, R., Donfrancesco, A., Federici, V., Giacomini, P., Peschle, C. & Fruci, D. (2008). Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PLoS One*, **3**(5), e2236.
- Fossat, N., Radziewic, T., Jones, V., Tourle, K. & Tam, P.P. (2016). Conditional restoration and inactivation of Rbm47 reveal its tissue-context requirement for viability and growth. *Genesis*, **54**(3), 115-22.
- Fossat, N., Tourle, K., Radziewic, T., Barratt, K., Liebhold, D., Studdert, J.B., Power, M., Jones, V., Loebel, D.A. & Tam, P.P. (2014). C to U RNA editing mediated by APOBEC1 requires RNA-binding protein RBM47. *EMBO Rep*, **15**(8), 903-10.
- Frantz, B., Klatt, T., Pang, M., Parsons, J., Rolando, A., Williams, H., Tocci, M.J., O'Keef, S.J. & O'Neill, E.A. (1998). The Activation State of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Determines the Efficiency of ATP Competition for Pyridinylimidazole Inhibitor Binding. *Biochemistry*, **37**(39), 13846-53.
- Frevel, M.A., Bakheet, T., Silva, A.M., Hissong, J.G., Khabar, K.S. & Williams, B.R. (2003). p38 Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent



- signaling of mRNA stability of AU-rich element-containing transcripts. *Mol Cell Biol*, **23**(2), 425-36.
- Frippiat, C., Chen, Q.M., Zdanov, S., Magalhaes, J.P., Remacle, J. & Toussaint, O. (2001). Subcytotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem*, **276**(4), 2531-7.
- Fuchs, S.Y., Adler, V., Buschmann, T., Yin, Z., Wu, X., Jones, S.N. & Ronai, Z. (1998a). JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev*, **12**(17), 2658-63.
- Fuchs, S.Y., Adler, V., Pincus, M.R. & Ronai, Z. (1998b). MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(18), 10541-6.
- Gallardo, M., Hornbaker, M.J., Zhang, X., Hu, P., Bueso-Ramos, C. & Post, S.M. (2016). Aberrant hnRNP K expression: All roads lead to cancer. *Cell Cycle*, **15**(12), 1552-7.
- Garcia-Calvo, M., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Vaillancourt, J.P., Zamboni, R., Nicholson, D.W. & Thornberry, N.A. (1999). Purification and catalytic properties of human caspase family members. *Cell Death Differ*, **6**(4), 362-9.
- Gartel, A.L. & Tyner, A.L. (1999). Transcriptional regulation of the p21<sup>(WAF1/CIP1)</sup> gene. *Exp Cell Res*, **146**(2), 280-9.
- Gartel, A.L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F. & Tyner, A.L. (2001). Myc represses the p21<sup>(WAF1/CIP1)</sup> promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(8), 4510-5.
- Gerstberger, S., Hafner, M. & Tuschl, T. (2014). A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet*, **15**(12), 829-45.
- Gibson, E.G., King, M.M., Mercer, S.L. & Dewese, J.E. (2016). Two-Mechanism Model for the Interaction of Etoposide Quinone with Topoisomerase IIalpha. *Chem Res Toxicol*, **29**(9), 1541-8.
- Giles, K.M., Daly, J.M., Beveridge, D.J., Thomson, A.M., Voon, D.C., Furneaux, H.M., Jazayeri, J.A. & Leedman, P.J. (2003). The 3'-untranslated region of p21<sup>WAF1</sup> mRNA is a composite cis-acting sequence bound by RNA-binding proteins from breast cancer cells, including HuR and poly(C)-binding protein. *J Biol Chem*, **278**(5), 2937-46.
- Glisovic, T., Bachorik, J.L., Yong, J. & Dreyfuss, G. (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett*, **582**(14), 1977-86.
- Gong, X., Wang, M., Tashiro, S.-i., Onodera, S. & Ikejima, T. (2006). Involvement of JNK-initiated p53 accumulation and phosphorylation of p53 in pseudolaric acid B induced cell death. *Exp Mol Med*, **38**(4), 428-34.
- Graupner, V., Schulze-Osthoff, K., Essmann, F. & Jänicke, R.U. (2009). Functional characterization of p53beta and p53gamma, two isoforms of the tumor suppressor p53. *Cell Cycle*, **8**(8), 1238-48.
- Green, D.R. & Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*, **458**(7242), 1127-30.
- Gu, J., Kawai, H., Nie, L., Kitao, H., Wiederschain, D., Jochemsen, A.G., Parant, J., Lozano, G. & Yuan, Z.M. (2002). Mutual dependence of MDM2 and MDMX in their functional inactivation of p53. *J Biol Chem*, **277**(22), 19251-4.
- Guan, R., El-Rass, S., Spillane, D., Lam, S., Wang, Y., Wu, J., Chen, Z., Wang, A., Jia, Z., Keating, A., Hu, J. & Wen, X.Y. (2013). rbm47, a novel RNA binding protein, regulates zebrafish head development. *Dev Dyn*, **242**(12), 1395-404.



- Habelhah, H., Shah, K., Huang, L., Burlingame, A.L., Shokat, K.M. & Ronai, Z. (2001a). Identification of new JNK substrate using ATP pocket mutant JNK and a corresponding ATP analogue. *J Biol Chem*, **276**(21), 18090-5.
- Habelhah, H., Shah, K., Huang, L., Ostareck-Lederer, A., Burlingame, A.L., Shokat, K.M., Hentze, M.W. & Ronai, Z.e. (2001b). ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nat Cell Biol*, **3**(3), 325-30.
- Hamilton, E. & Infante, J.R. (2016). Targeting CDK4/6 in patients with cancer. *Cancer Treat Rev*, **45**, 129-38.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**(5), 646-74.
- Harley, C.B., Futcher, A.B. & Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, **345**(6274), 458-60.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, **75**(4), 805-16.
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. & Haupt, Y. (2003). Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*, **116**(Pt 20), 4077-85.
- Haupt, S., Mejia-Hernandez, J.O., Vijayakumaran, R., Keam, S.P. & Haupt, Y. (2019). The long and the short of it: the MDM4 tail so far. *J Mol Cell Biol*, **11**(3), 231-44.
- Hayflick, L. & Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid strains. *Exp Cell Res*, **25**, 585-621.
- He, S. & Sharpless, N.E. (2017). Senescence in Health and Disease. *Cell*, **169**(6), 1000-11.
- Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P., Chen, D.J. & Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21<sup>CIP1</sup>, but not p16<sup>INK4a</sup>. *Mol Cell*, **14**(4), 501-13.
- Ho, J. & Benchimol, S. (2003). Transcriptional repression mediated by the p53 tumour suppressor. *Cell Death Differ*, **10**(4), 404-8.
- Ho, P.Y., Hsu, S.P., Liang, Y.C., Kuo, M.L., Ho, Y.S. & Lee, W.S. (2008). Inhibition of the ERK phosphorylation plays a role in terbinafine-induced p21 up-regulation and DNA synthesis inhibition in human vascular endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, **229**(1), 86-93.
- Horn, H.F. & Vousden, K.H. (2007). Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene*, **26**(9), 1306-16.
- Huang, S., New, L., Pan, Z., Han, J. & Nemerow, G.R. (2000). Urokinase plasminogen activator/urokinase-specific surface receptor expression and matrix invasion by breast cancer cells requires constitutive p38alpha mitogen-activated protein kinase activity. *J Biol Chem*, **275**(16), 12266-72.
- Hui, L., Zatloukal, K., Scheuch, H., Stepniak, E. & Wagner, E.F. (2008). Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation. *J Clin Invest*, **118**(12), 3943-53.
- Iakova, P., Wang, G.L., Timchenko, L., Michalak, M., Pereira-Smith, O.M., Smith, J.R. & Timchenko, N.A. (2004). Competition of CUGBP1 and calreticulin for the regulation of p21 translation determines cell fate. *EMBO J*, **23**(2), 406-17.
- Ivanovska, I., Ball, A.S., Diaz, R.L., Magnus, J.F., Kibukawa, M., Schelter, J.M., Kobayashi, S.V., Lim, L., Burchard, J., Jackson, A.L., Linsley, P.S. & Cleary, M.A.

- (2008). MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression. *Mol Cell Biol*, **28**(7), 2167-74.
- Jackson, M.W. & Berberich, S.J. (2000). MdmX protects p53 from Mdm2-mediated degradation. *Mol Cell Biol*, **20**(3), 1001-7.
- Jänicke, R.U., Sohn, D., Essmann, F. & Schulze-Osthoff, K. (2007). The multiple battles fought by anti-apoptotic p21. *Cell Cycle*, **6**(4), 407-13.
- Jänicke, R.U., Sohn, D. & Schulze-Osthoff, K. (2008). The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53. *Cell Death Differ*, **15**(6), 959-76.
- Jänicke, R.U., Sprengart, M.L., Wati, M.R. & Porter, A.G. (1998). Caspase-3 Is Required for DNA Fragmentation and Morphological Changes Associated With Apoptosis. *J Biol Chem*, **273**(16), 9357-60.
- Jascur, T., Brickner, H., Salles-Passador, I., Barbier, V., El Khissiin, A., Smith, B., Fotedar, R. & Fotedar, A. (2005). Regulation of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> stability by WISp39, a Hsp90 binding TPR protein. *Mol Cell*, **17**(2), 237-49.
- Jiang, Y., Zhang, M., Qian, Y., Xu, E., Zhang, J. & Chen, X. (2014). Rbm24, an RNA-binding protein and a target of p53, regulates p21 expression via mRNA stability. *J Biol Chem*, **289**(6), 3164-75.
- Joerger, A.C. & Fersht, A.R. (2010). The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2**(6), a000919.
- Johnson, G.L. & Lapadat, R. (2002). Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science*, **298**(5600), 1911-2.
- Jones, K.R., Elmore, L.W., Jackson-Cook, C., Demasters, G., Povirk, L.F., Holt, S.E. & Gewirtz, D.A. (2005). p53-Dependent accelerated senescence induced by ionizing radiation in breast tumour cells. *Int J Radiat Biol*, **81**(6), 445-58.
- Jones, S.N., Roe, A.E., Donehower, L.A. & Bradley, A. (1995). Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature*, **378**(6553), 206-8.
- Joseph, B., Orlan, M. & Furneaux, H.M. (1998). p21<sup>waf1</sup> mRNA contains a conserved element in its 3'-untranslated region that is bound by the Elav-like mRNA-stabilizing proteins. *J Biol Chem*, **273**(32), 20511-6.
- Jost, P.J., Grabow, S., Gray, D., McKenzie, M.D., Nachbur, U., Huang, D.C., Bouillet, P., Thomas, H.E., Borner, C., Silke, J., Strasser, A. & Kaufmann, T. (2009). XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature*, **460**(7258), 1035-9.
- Jung, P., Menssen, A., Mayr, D. & Hermeking, H. (2008). AP4 encodes a c-MYC-inducible repressor of p21. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**(39), 15046-51.
- Jung, Y.S., Qian, Y. & Chen, X. (2010). Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell Signal*, **22**(7), 1003-12.
- Kang, T.W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., Iken, M., Vucur, M., Weiss, S., Heikenwalder, M., Khan, S., Gil, J., Bruder, D., Manns, M., Schirmacher, P., Tacke, F., Ott, M., Luedde, T., Longerich, T., Kubicka, S. & Zender, L. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*, **479**(7374), 547-51.
- Karni-Schmidt, O., Lokshin, M. & Prives, C. (2016). The Roles of MDM2 and MDMX in Cancer. *Annu Rev Pathol*, **11**, 617-44.
- Kastan, M.B. & Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, **432**(7015), 316-23.

- Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Craig, R.W. (1991). Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage. *Cancer Res*, **51**(23 Part 1), 6304-11.
- Kastan, M.B., Zhan, Q., El-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B. & Fornace, A.J. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, **71**(4), 587-97.
- Kastenhuber, E.R. & Lowe, S.W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell*, **170**(6), 1062-78.
- Katakura, Y., Nakata, E., Miura, T. & Shirahata, S. (1999). Transforming growth factor beta triggers two independent-senescence programs in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **255**(1), 110-5.
- Kawai, H., Wiederschain, D., Kitao, H., Stuart, J., Tsai, K.K. & Yuan, Z.M. (2003). DNA damage-induced MDMX degradation is mediated by MDM2. *J Biol Chem*, **278**(46), 45946-53.
- Kennedy, N.J. & Davis, R.J. (2003). Role of JNK in tumor development. *Cell Cycle*, **2**(3), 199-201.
- Kern, S.E., Kinzler, K.W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C. & Vogelstein, B. (1991). Identification of p53 as a Sequence-Specific DNA-Binding Protein. *Science*, **252**(5013), 1708-77.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, **26**(4), 239-57.
- Kim, G.Y., Mercer, S.E., Ewton, D.Z., Yan, Z., Jin, K. & Friedman, E. (2002). The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21<sup>Cip1</sup> by phosphorylation. *J Biol Chem*, **277**(33), 29792-802.
- Kim, Y.E., Won, M., Lee, S.G., Park, C., Song, C.H. & Kim, K.K. (2019). RBM47-regulated alternative splicing of TJP1 promotes actin stress fiber assembly during epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene*, **38**, 6521-36.
- Kim, Y.K., Yu, J., Han, T.S., Park, S.Y., Namkoong, B., Kim, D.H., Hur, K., Yoo, M.W., Lee, H.J., Yang, H.K. & Kim, V.N. (2009). Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer. *Nucleic Acids Res*, **37**(5), 1672-81.
- Kirch, H.-C., Flaswinkel, S., Rumpf, H., Brockmann, D. & Esche, H. (1999). Expression of human p53 requires synergistic activation of transcription from the p53 promoter by AP-1, NF- $\kappa$ B and Myc/Max. *Oncogene*, **18**(17), 2728-38.
- Kolosenko, I., Fryknäs, M., Forsberg, S., Johnsson, P., Cheon, H., Holvey-Bates, E.G., Edsbacker, E., Pellegrini, P., Rassoolzadeh, H., Brnjic, S., Larsson, R., Stark, G.R., Grandér, D., Linder, S., Tamm, K.P. & De Milito, A. (2015). Cell crowding induces interferon regulatory factor 9, which confers resistance to chemotherapeutic drugs. *Int J Cancer*, **136**(4), E51-61.
- Kruiswijk, F., Labuschagne, C.F. & Vousden, K.H. (2015). p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **16**(7), 393-405.
- Kumari, G., Ulrich, T. & Gaubatz, S. (2013). A role for p38 in transcriptional elongation of p21<sup>CIP1</sup> in response to Aurora B inhibition. *Cell Cycle*, **12**(13), 2051-60.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y. & Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, **113**(Pt 20), 3613-22.

- Lafarga, V., Cuadrado, A., Lopez de Silanes, I., Bengoechea, R., Fernandez-Capetillo, O. & Nebreda, A.R. (2009). p38 Mitogen-activated protein kinase- and HuR-dependent stabilization of p21<sup>Cip1</sup> mRNA mediates the G<sub>1</sub>/S checkpoint. *Mol Cell Biol*, **29**(16), 4341-51.
- Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Kawai, T., Yang, X., Martindale, J.L. & Gorospe, M. (2004). Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *EMBO J*, **23**(15), 3092-102.
- Lane, D.P. (1992). p53, guardian of the genome. *Nature*, **358**(6381), 15-6.
- Lane, D.P. & Crawford, L.V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, **278**(5701), 261-3.
- Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., Strickler, J.E., McLaughlin, M.M., Siemens, I.R., Fisher, S.M., Livi, G.P., White, J.R., Adams, J.L. & Young, P.R. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, **372**(6508), 739-46.
- Li, G., Luna, C., Qiu, J., Epstein, D.L. & Gonzalez, P. (2009). Alterations in microRNA expression in stress-induced cellular senescence. *Mech Ageing Dev*, **130**(11-12), 731-41.
- Li, M., Brooks, C.L., Wu-Bear, F., Chen, D., Bear, R. & Gu, W. (2003). Mono- Versus Polyubiquitination: Differential Control of p53 Fate by Mdm2. *Science*, **302**(5652), 1972-5.
- Linker, K., Pautz, A., Fehrer, M., Hubrich, T., Greeve, J. & Kleinert, H. (2005). Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR. *Nucleic Acids Res*, **33**(15), 4813-27.
- Linzer, D.I.H. & Levine, A.J. (1979). Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, **17**(1), 43-52.
- Liu, B., Han, M., Sun, R.-H., Wang, J.-J., Zhang, Y.-P., Zhang, D.Q. & Wen, J.K. (2010). ABL-N-induced apoptosis in human breast cancer cells is partially mediated by c-Jun NH2-terminal kinase activation. *Breast Cancer Res*, **12**(1), R9.
- Liu, H., Hew, H.C., Lu, Z.G., Yamaguchi, T., Miki, Y. & Yoshida, K. (2009). DNA damage signalling recruits RREB-1 to the p53 tumour suppressor promoter. *Biochem J*, **422**(3), 543-51.
- Liu, J., Zhang, C., Zhao, Y. & Feng, Z. (2017). MicroRNA Control of p53. *J Cell Biochem*, **118**(1), 7-14.
- Lu, Z. & Xu, S. (2006). ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life*, **58**(11), 621-31.
- Lunde, B.M., Moore, C. & Varani, G. (2007). RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**(6), 479-90.
- Malumbres, M. & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*, **9**(3), 153-66.
- Mancini, F., Di Conza, G. & Moretti, F. (2009). MDM4 (MDMX) and its Transcript Variants. *Curr Genomics*, **10**(1), 42-50.
- Mazan-Mamczarz, K., Galbán, S., López de Silanes, I., Martindale, J.L., Atasoy, U., Keene, J.D. & Gorospe, M. (2003). RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(14), 8354-9.



- McIlwain, D.R., Berger, T. & Mak, T.W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **5**(4), a008656.
- McLure, K.G. & Lee, P.W.K. (1998). How p53 binds DNA as a tetramer. *EMBO J*, **17**(2), 3342-50.
- Meek, D.W. & Anderson, C.W. (2009). Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **1**(6), a000950.
- Meloche, S. & Pouysségur, J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G<sub>1</sub>- to S-phase transition. *Oncogene*, **26**(22), 3227-39.
- Migliorini, D., Danovi, D., Colombo, E., Carbone, R., Pelicci, P.G. & Marine, J.C. (2002). Hdmx recruitment into the nucleus by Hdm2 is essential for its ability to regulate p53 stability and transactivation. *J Biol Chem*, **277**(9), 7318-23.
- Miller, D.M., Thomas, S.D., Islam, A., Muench, D. & Sedoris, K. (2012). c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res*, **18**(20), 5546-53.
- Minagawa, S., Araya, J., Numata, T., Nojiri, S., Hara, H., Yumino, Y., Kawaishi, M., Odaka, M., Morikawa, T., Nishimura, S.L., Nakayama, K. & Kuwano, K. (2011). Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT6 in TGF- $\beta$ -induced senescence of human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **300**(3), L391-L401.
- Morgan, D.O. (1995). Principles of CDK Regulation. *Nature*, **374**(6518), 131-4.
- Morrison, D.K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**(11), a011254.
- Moustakas, A. & Kardassis, D. (1998). Regulation of the human p21/WAF1/Cip1 promoter in hepatic cells by functional interactions between Sp1 and Smad family members. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(12), 6733-8.
- Müller-McNicoll, M. & Neugebauer, K.M. (2013). How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA-protein complexes. *Nat Rev Genet*, **14**, 275.
- Munoz-Espin, D., Canamero, M., Maraver, A., Gomez-Lopez, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodriguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M. & Serrano, M. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*, **155**(5), 1104-18.
- Munoz-Espin, D. & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **15**(7), 482-96.
- Murray-Zmijewski, F., Slee, E.A. & Lu, X. (2008). A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**(9), 702-12.
- Nagata, S. (2018). Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu Rev Immunol*, **36**, 489-517.
- Narita, M., Nuñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J. & Lowe, S.W. (2003). Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence. *Cell*, **113**(6), 703-16.
- Olivos, D.J. & Mayo, L.D. (2016). Emerging Non-Canonical Functions and Regulation by p53: p53 and Stemness. *Int J Mol Sci*, **17**(12).
- Olsson, A., Manzl, C., Strasser, A. & Villunger, A. (2007). How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression? *Cell Death Differ*, **14**(9), 1561-75.



- Ostrovsky, O. & Bengal, E. (2003). The mitogen-activated protein kinase cascade promotes myoblast cell survival by stabilizing the cyclin-dependent kinase inhibitor, p21<sup>WAF1</sup> protein. *J Biol Chem*, **278**(23), 21221-31.
- Otto, T. & Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **17**(2), 93-115.
- Pan, Y. & Chen, J. (2003). MDM2 Promotes Ubiquitination and Degradation of MDMX. *Mol Cell Biol*, **23**(15), 5113-21.
- Parant, J., Chavez-Reyes, A., Little, N.A., Yan, W., Reinke, V., Jochemsen, A.G. & Lozano, G. (2001). Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nat Genet*, **29**(1), 92-5.
- Park, K.S., Ahn, Y., Kim, J.A., Yun, M.S., Seong, B.L. & Choi, K.Y. (2002). Extracellular zinc stimulates ERK-dependent activation of p21<sup>Cip/WAF1</sup> and inhibits proliferation of colorectal cancer cells. *Br J Pharmacol*, **137**(5), 597-607.
- Parry, D., Mahony, D., Wills, K. & Lees, E. (1999). Cyclin D-CDK Subunit Arrangement Is Dependent on the Availability of Competing INK4 and p21 Class Inhibitors. *Mol Cell Biol*, **19**(3), 1775-83.
- Pei, D., Zhang, Y. & Zheng, J. (2012). Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and Mdmx. *Oncotarget*, **3**(3), 228-35.
- Pei, X.Y., Dai, Y. & Grant, S. (2003). The proteasome inhibitor bortezomib promotes mitochondrial injury and apoptosis induced by the small molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1 in multiple myeloma cells. *Leukemia*, **17**(10), 2036-45.
- Pereira, B., Billaud, M. & Almeida, R. (2017). RNA-Binding Proteins in Cancer: Old Players and New Actors. *Trends Cancer*, **3**(7), 506-28.
- Peters, D., Radine, C., Reese, A., Budach, W., Sohn, D. & Jänicke, R.U. (2017). The DEAD-box RNA helicase DDX41 is a novel repressor of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> mRNA translation. *J Biol Chem*, **292**(20), 8331-41.
- Petrocca, F., Visone, R., Onelli, M.R., Shah, M.H., Nicoloso, M.S., de Martino, I., Iliopoulos, D., Pillozzi, E., Liu, C.G., Negrini, M., Cavazzini, L., Volinia, S., Alder, H., Ruco, L.P., Baldassarre, G., Croce, C.M. & Vecchione, A. (2008). E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell*, **13**(3), 272-86.
- Phillips, A., Teunisse, A., Lam, S., Lodder, K., Darley, M., Emaduddin, M., Wolf, A., Richter, J., de Lange, J., Verlaan-de Vries, M., Lenos, K., Bohnke, A., Bartel, F., Blaydes, J.P. & Jochemsen, A.G. (2010). HDMX-L is expressed from a functional p53-responsive promoter in the first intron of the HDMX gene and participates in an autoregulatory feedback loop to control p53 activity. *J Biol Chem*, **285**(38), 29111-27.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A. & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, **8**(4), 603-19.
- Radine, C., Peters, D., Reese, A., Neuwahl, J., Budach, W., Jänicke, R.U. & Sohn, D. (2020). The RNA-binding protein RBM47 is a novel regulator of cell fate decisions by transcriptionally controlling the p53-p21-axis. *Cell Death Differ*, **27**(4), 1274-1285
- Rallapalli, R., Strachan, G., Cho, B., Mercer, W.E. & Hall, D.J. (1999). A novel MDMX transcript expressed in a variety of transformed cell lines encodes a truncated protein with potent p53 repressive activity. *J Biol Chem*, **274**(12), 8299-308.

- Rallapalli, R., Strachan, G., Tuan, R.S. & Hall, D.J. (2003). Identification of a domain within MDMX-S that is responsible for its high affinity interaction with p53 and high-level expression in mammalian cells. *J Cell Biochem*, **89**(3), 563-75.
- Ravichandran, K.S. (2011). Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity*, **35**(4), 445-55.
- Ray, D., Kazan, H., Cook, K.B., Weirauch, M.T., Najafabadi, H.S., Li, X., Gueroussov, S., Albu, M., Zheng, H., Yang, A., Na, H., Irimia, M., Matzat, L.H., Dale, R.K., Smith, S.A., Yarosh, C.A., Kelly, S.M., Nabet, B., Mecnas, D., Li, W., Laishram, R.S., Qiao, M., Lipshitz, H.D., Piano, F., Corbett, A.H., Carstens, R.P., Frey, B.J., Anderson, R.A., Lynch, K.W., Penalva, L.O., Lei, E.P., Fraser, A.G., Blencowe, B.J., Morris, Q.D. & Hughes, T.R. (2013). A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation. *Nature*, **499**(7457), 172-7.
- Reisman, D., Elkind, N.B., Roy, B., Beamon, J. & Rotter, V. (1993). c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif. *Cell Growth Differ*, **4**(2), 57-65.
- Riley, K.J. & Maher, L.J., 3rd. (2007). p53 RNA interactions: new clues in an old mystery. *RNA*, **13**(11), 1825-33.
- Rokavec, M., Kaller, M., Horst, D. & Hermeking, H. (2017). Pan-cancer EMT-signature identifies RBM47 down-regulation during colorectal cancer progression. *Sci Rep*, **7**(1), 4687.
- Rössig, L., Jadidi, A.S., Urbich, C., Badorff, C., Zeiher, A.M. & Dimmeler, S. (2001). Akt-dependent phosphorylation of p21<sup>Cip1</sup> regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol Cell Biol*, **21**(16), 5644-57.
- Roy, B., Beamon, J., Balint, E. & Reisman, D. (1994). Transactivation of the human p53 tumor suppressor gene by c-Myc/Max contributes to elevated mutant p53 expression in some tumors. *Mol Cell Biol*, **14**(12), 7805-15.
- Roy, R., Chun, J. & Powell, S.N. (2011). BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer*, **12**(1), 68-78.
- Rutault, K., Hazzalin, C.A. & Mahadevan, L.C. (2001). Combinations of ERK and p38 MAPK inhibitors ablate tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) mRNA induction. Evidence for selective destabilization of TNF-alpha transcripts. *J Biol Chem*, **276**(9), 6666-74.
- Saha, K., Adhikary, G., Kanade, S.R., Rorke, E.A. & Eckert, R.L. (2014). p38delta regulates p53 to control p21<sup>Cip1</sup> expression in human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem*, **289**(16), 11443-53.
- Sakurai, T., Isogaya, K., Sakai, S., Morikawa, M., Morishita, Y., Ehata, S., Miyazono, K. & Koinuma, D. (2016). RNA-binding motif protein 47 inhibits Nrf2 activity to suppress tumor growth in lung adenocarcinoma. *Oncogene*, **35**(38), 5000-9.
- Saldana-Meyer, R. & Recillas-Targa, F. (2011). Transcriptional and epigenetic regulation of the p53 tumor suppressor gene. *Epigenetics*, **6**(9), 1068-77.
- Scott, D.D. & Oeffinger, M. (2016). Nucleolin and nucleophosmin: nucleolar proteins with multiple functions in DNA repair. *Biochem Cell Biol*, **94**(5), 419-32.
- Scoumanne, A., Cho, S.J., Zhang, J. & Chen, X. (2011). The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is regulated by RNA-binding protein PCBP4 via mRNA stability. *Nucleic Acids Res*, **39**(1), 213-24.
- Senturk, S., Mumcuoglu, M., Gursoy-Yuzugullu, O., Cingoz, B., Akcali, K.C. & Ozturk, M. (2010). Transforming growth factor-beta induces senescence in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth. *Hepatology*, **52**(3), 966-74.

- Seoane, J., Le, H.V., Shen, L., Anderson, S.A. & Massagué, J. (2004). Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell*, **117**(2), 211-23.
- Shadfan, M., Lopez-Pajares, V. & Yuan, Z.M. (2012). MDM2 and MDMX: alone and together in regulation of p53. *Transl Cancer Res*, **2**, 88-9.
- Shan, G. (2010). RNA interference as a gene knockdown technique. *Int J Biochem Cell Biol*, **42**(8), 1243-51.
- Sharp, D.A., Kratowicz, S.A., Sank, M.J. & George, D.L. (1999). Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. *J Biol Chem*, **274**(53), 38189-96.
- Sharpless, N.E. & Sherr, C.J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nat Rev Cancer*, **15**(7), 397-408.
- She, Q.B., Chen, N. & Dong, Z. (2000). ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. *J Biol Chem*, **275**(27), 20444-9.
- Sherr, C.J. & McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathway in cancer. *Cancer Cell*, **2**(2), 103-12.
- Shieh, S.-Y., Ikeda, M., Taya, Y. & Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, **91**(3), 325-34.
- Shimada, N., Rios, I., Moran, H., Sayers, B. & Hubbard, K. (2009). p38 MAP kinase-dependent regulation of the expression level and subcellular distribution of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and its involvement in cellular senescence in normal human fibroblasts. *RNA Biol*, **6**(3), 293-304.
- Shu, L., Yan, W. & Chen, X. (2006). RNPC1, an RNA-binding protein and a target of the p53 family, is required for maintaining the stability of the basal and stress-induced p21 transcript. *Genes Dev*, **20**(21), 2961-72.
- Sohn, D., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K. & Jänicke, R.U. (2006). p21 blocks irradiation-induced apoptosis downstream of mitochondria by inhibition of cyclin-dependent kinase-mediated caspase-9 activation. *Cancer Res*, **66**(23), 11254-62.
- Sokolova, V., Fiorino, A., Zoni, E., Crippa, E., Reid, J.F., Gariboldi, M. & Pierotti, M.A. (2015). The Effects of miR-20a on p21: Two Mechanisms Blocking Growth Arrest in TGF-beta-Responsive Colon Carcinoma. *J Cell Physiol*, **230**(12), 3105-14.
- Somasundaram, K., Zhang, H., Zeng, Y.X., Houvras, Y., Peng, Y., Zhang, H., Wu, G.S., Licht, J.D., Weber, B.L. & El-Deiry, W.S. (1997). Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. *Nature*, **389**(6647), 187-90.
- Soni, S., Anand, P. & Padwad, Y.S. (2019). MAPKAPK2: the master regulator of RNA-binding proteins modulates transcript stability and tumor progression. *J Exp Clin Cancer Res*, **38**(1), 121.
- Speidel, D. (2010). Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol*, **20**(1), 14-24.
- Stad, R., Little, N.A., Xirodimas, D.P., Frenk, R., Van Der Eb, A.J., Lane, D.P., Saville, M.K. & Jochemsen, A.G. (2001). Mdmx stabilizes p53 and Mdm2 via two distinct mechanisms. *EMBO Rep*, **2**(11), 1029-34.
- Stad, R., Ramos, Y.F., Little, N., Grivell, S., Attema, J., van Der Eb, A.J. & Jochemsen, A.G. (2000). Hdmx stabilizes Mdm2 and p53. *J Biol Chem*, **275**(36), 28039-44.

- Steinman, H.A., Hoover, K.M., Keeler, M.L., Sands, A.T. & Jones, S.N. (2005). Rescue of Mdm4-deficient mice by Mdm2 reveals functional overlap of Mdm2 and Mdm4 in development. *Oncogene*, **24**(53), 7935-40.
- Stommel, J.M. & Wahl, G.M. (2004). Accelerated MDM2 auto-degradation induced by DNA-damage kinases is required for p53 activation. *EMBO J*, **23**(7), 1547-56.
- Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M.C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J. & Keyes, W.M. (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*, **155**(5), 1119-30.
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y. & Yu, Q. (2015). Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol Cancer*, **14**, 48.
- Sugiura, R., Satoh, R., Ishiwata, S., Umeda, N. & Kita, A. (2011). Role of RNA-Binding Proteins in MAPK Signal Transduction Pathway. *J Signal Transduct*, **2011**, 109746.
- Sury, M.D., McShane, E., Hernandez-Miranda, L.R., Birchmeier, C. & Selbach, M. (2015). Quantitative proteomics reveals dynamic interaction of c-Jun N-terminal kinase (JNK) with RNA transport granule proteins splicing factor proline- and glutamine-rich (Sfpq) and non-POU domain-containing octamer-binding protein (Nono) during neuronal differentiation. *Mol Cell Proteomics*, **14**(1), 50-65.
- Suzuki, A., Tsutomi, Y., Akahane, K., Araki, T. & Miura, M. (1998). Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of Caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21<sup>WAF1</sup> and IAP gene family ILP. *Oncogene*, **17**(8), 931-9.
- Suzuki, H., Romano-Spica, V., Papas, T.S. & Bhat, N.K. (1995). ETS1 suppresses tumorigenicity of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(10), 4442-6.
- Takagi, M., Absalon, M.J., McLure, K.G. & Kastan, M.B. (2005). Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell*, **123**(1), 49-63.
- Takaoka, A., Hayakawa, S., Yanai, H., Stoiber, D., Negishi, H., Kikuchi, H., Sasaki, S., Imai, K., Shibue, T., Honda, K. & Taniguchi, T. (2003). Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature*, **424**(6948), 516-23.
- Thornton, T.M. & Rincon, M. (2009). Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *International journal of biological sciences*, **5**(1), 44-51.
- Tiedje, C., Lubas, M., Tehrani, M., Menon, M.B., Ronkina, N., Rousseau, S., Cohen, P., Kotlyarov, A. & Gaestel, M. (2015). p38MAPK/MK2-mediated phosphorylation of RBM7 regulates the human nuclear exosome targeting complex. *RNA*, **21**(2), 262-78.
- Toledo, F. & Wahl, G.M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer*, **6**(12), 909-23.
- Trimarchi, J.M. & Lees, J.A. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**(1), 11-20.
- Unal Cevik, I. & Dalkara, T. (2003). Intravenously administered propidium iodide labels necrotic cells in the intact mouse brain after injury. *Cell Death Differ*, **10**(8), 928-9.
- Vanharanta, S., Marney, C.B., Shu, W., Valiente, M., Zou, Y., Mele, A., Darnell, R.B. & Massague, J. (2014). Loss of the multifunctional RNA-binding protein RBM47 as a source of selectable metastatic traits in breast cancer. *Elife*, **3**(e02734).



- Vaseva, A.V. & Moll, U.M. (2009). The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta*, **1787**(5), 414-20.
- Verfaillie, A., Svetlichnyy, D., Imrichova, H., Davie, K., Fiers, M., Kalender Atak, Z., Hulselmans, G., Christiaens, V. & Aerts, S. (2016). Multiplex enhancer-reporter assays uncover unsophisticated TP53 enhancer logic. *Genome Res*, **26**(7), 882-95.
- Vignard, J., Mirey, G. & Salles, B. (2013). Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: a direct and indirect lighting up. *Radiother Oncol*, **108**(3), 362-9.
- Visconti, R., Della Monica, R. & Grieco, D. (2016). Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. *J Exp Clin Cancer Res*, **35**(1), 153.
- Vogelstein, B. (1990). A deadly inheritance. *Nature*, **348**(6303), 681-2.
- Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D. & Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*, **369**(6481), 574-8.
- Waggoner, S.A., Johannes, G.J. & Liebhauer, S.A. (2009). Depletion of the poly(C)-binding proteins alphaCP1 and alphaCP2 from K562 cells leads to p53-independent induction of cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN1A) and G1 arrest. *J Biol Chem*, **284**(14), 9039-49.
- Wang, S. & El-Deiry, W.S. (2006). p73 or p53 directly regulates human p53 transcription to maintain cell cycle checkpoints. *Cancer Res*, **66**(14), 6982-9.
- Wang, W., Furneaux, H., Cheng, H., Caldwell, M.C., Hutter, D., Liu, Y., Holbrook, N. & Gorospe, M. (2000). HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Mol Cell Biol*, **20**(3), 760-9.
- Wang, X., Wang, J. & Jiang, X. (2011). MdmX protein is essential for Mdm2 protein-mediated p53 polyubiquitination. *J Biol Chem*, **286**(27), 23725-34.
- Warfel, N.A. & El-Deiry, W.S. (2013). p21WAF1 and tumourigenesis: 20 years after. *Curr Opin Oncol*, **25**(1), 52-8.
- Watanabe, S., Kawamoto, S., Ohtani, N. & Hara, E. (2017). Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases. *Cancer Sci*, **108**(4), 563-9.
- Wei, Y., Zhang, F., Zhang, Y., Wang, X., Xing, C., Guo, J., Zhang, H., Suo, Z., Li, Y., Wang, J., Wang, R. & Cai, Z. (2018). Post-transcriptional regulator Rbm47 elevates IL-10 production and promotes the immunosuppression of B cells. *Cell Mol Immunol*, **16**(6), 580-9.
- Wu, S., Huang, S., Ding, J., Zhao, Y., Liang, L., Liu, T., Zhan, R. & He, X. (2010). Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. *Oncogene*, **29**(15), 2302-8.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D. & Levine, A.J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*, **7**(7A), 1126-32.
- Wurth, L. (2012). Versatility of RNA-Binding Proteins in Cancer. *Comp Funct Genomics*, **2012**, 178525.
- Xia, W., Chen, J.S., Zhou, X., Sun, P.R., Lee, D.F., Liao, Y., Zhou, B.P. & Huang, M.C. (2004). Phosphorylation/cytoplasmic localization of p21<sup>Cip1/WAF1</sup> is associated with HER2/neu overexpression and provides a novel combination predictor for poor prognosis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, **10**(11), 3815-24.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. & Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, **366**(6456), 701-4.



- Xu, D., Wilson, T.J., Chan, D., De Luca, E., Zhou, J., Hertzog, P.J. & Kola, I. (2002). Ets1 is required for p53 transcriptional activity in UV-induced apoptosis in embryonic stem cells. *EMBO J*, **21**(15), 4081-93.
- Xu, S.Q. & El-Deiry, W.S. (2000). p21<sup>WAF1/CIP1</sup> inhibits initiator caspase cleavage by TRAIL death receptor DR4. *Biochem Biophys Res Commun*, **269**(1), 179-90.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovskiy, V., Cordon-Cardo, C. & Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, **445**(7128), 656-60.
- Yang, X., Wang, W., Fan, J., Lal, A., Yang, D., Cheng, H. & Gorospe, M. (2004). Prostaglandin A2-mediated stabilization of p21 mRNA through an ERK-dependent pathway requiring the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem*, **279**(47), 49298-306.
- Yang, Y., Park, J.W., Bebee, T.W., Warzecha, C.C., Guo, Y., Shang, X., Xing, Y. & Carstens, R.P. (2016). Determination of a Comprehensive Alternative Splicing Regulatory Network and Combinatorial Regulation by Key Factors during the Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Mol Cell Biol*, **36**(11), 1704-19.
- Yano, M., Okano, H.J. & Okano, H. (2005). Involvement of Hu and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in neuronal differentiation through p21 mRNA post-transcriptional regulation. *J Biol Chem*, **280**(13), 12690-9.
- Young, P.R., McLaughlin, M.M., Kumar, S., Kassis, S., Doyle, M.L., McNulty, D., Gallagher, T.F., Fisher, S., McDonnell, P.C., Carr, S.A., Huddleston, M.J., Seibel, G., Porter, T.G., Livi, G.P., Adams, J.L. & Lee, J.C. (1997). Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J Biol Chem*, **272**(18), 12116-21.
- Yu, Q., Katlinskaya, Y.V., Carbone, C.J., Zhao, B., Katlinski, K.V., Zheng, H., Guha, M., Li, N., Chen, Q., Yang, T., Lengner, C.J., Greenberg, R.A., Johnson, F.B. & Fuchs, S.Y. (2015). DNA-damage-induced type I interferon promotes senescence and inhibits stem cell function. *Cell Rep*, **11**(5), 785-97.
- Zarubin, T. & Han, J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*, **15**, 11-8.
- Zhang, J. & Chen, X. (2008). Posttranscriptional regulation of p53 and its targets by RNA-binding proteins. *Curr Mol Med*, **8**(8), 845-9.
- Zhang, J., Cho, S.J., Shu, L., Yan, W., Guerrero, I., Kent, M., Skorupski, K., Chen, H. & Chen, X. (2011). Translational repression of p53 by RNPC1, a p53 target overexpressed in lymphomas. *Genes Dev*, **25**(14), 1528-43.
- Zhang, M., Zhang, Y., Xu, E., Mohibi, S., de Anda, D.M., Jiang, Y., Zhang, J. & Chen, X. (2018). Rbm24, a target of p53, is necessary for proper expression of p53 and heart development. *Cell Death Differ*, **25**(6), 1118-30.
- Zhang, Y., Fujita, N. & Tsuruo, T. (1999). Caspase-mediated cleavage of p21<sup>Waf1/Cip1</sup> converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene*, **18**(5), 1131-8.
- Zhang, Y., Gao, J.S., Tang, X., Tucker, L.D., Quesenberry, P., Rigoutsos, I. & Ramratnam, B. (2009). MicroRNA 125a and its regulation of the p53 tumor suppressor gene. *FEBS Lett*, **583**(22), 3725-30.
- Zhang, Y.Z., Naleway, J.J., Larison, K.D., Huang, Z.J. & Haugland, R.P. (1991). Detecting lacZ Gene Expression in Living Cells With New Lipophilic, Fluorogenic Beta-Galactosidase Substrates. *FASEB J*, **5**(15), 3108-13.

- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H. & Huang, M.C. (2001). Cytoplasmic localization of p21<sup>Cip1/WAF1</sup> by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol*, **3**(3), 245-52.
- Zhu, H., Nie, L. & Maki, C.G. (2005). Cdk2-dependent Inhibition of p21 stability via a C-terminal cyclin-binding motif. *J Biol Chem*, **280**(32), 29282-8.

## **7. Anhang**

### **7.1 Erklärung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in der hier vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, März 2020

Claudia Radine

## 7.2 Publikationen

**Teile dieser Dissertation sind in der folgenden Publikation veröffentlicht:**

Radine, C., Peters, D., Reese, A., Neuwahl, J., Budach, W., Jänicke, R.U. & Sohn, D. (2020). The RNA-binding protein RBM47 is a novel regulator of cell fate decisions by transcriptionally controlling the p53-p21-axis. *Cell Death Differ*, **27**(4), 1274-1285 (published online ahead of print, 2019, Sep 11).

Die Daten oder Teile der Daten der Abbildungen 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 32, 33A, 34 sind Bestandteil der obengenannten Veröffentlichung.

Folgende Arbeiten wurden dabei von der Autorin Claudia Radine durchgeführt:

- Planung und Durchführung der Versuche
- Analyse der Daten
- Beteiligung an der Interpretation der Daten
- Prüfung des Manuskripts

**Publikationen außerhalb des Rahmens dieser Dissertation:**

Peters, D., Radine, C., Reese, A., Budach, W., Sohn, D. & Jänicke, R.U. (2017). The DEAD-box RNA helicase DDX41 is a novel repressor of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> mRNA translation. *J Biol Chem*, **292**(20), 8331-41.

Hüsemann, L.C., Reese, A., Radine, C., Piekorz, R.P., Budach, W., Sohn, D. & Jänicke, R.U. (2020). The microtubule targeting agents eribulin and paclitaxel activate similar signaling pathways and induce cell death predominantly in a caspase-independent manner. *Cell Cycle*, **19**(4), 464-478.

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

4D	Tetramerisierungsdomäne
A1CF	<i>APOBEC1 complementation factor</i>
ActD	Actinomycin D
AP-1/2	<i>Activator protein 1/2</i>
ARE	AU-reiche Elemente
AS	Aminosäure
ASK1	<i>Apoptosis signal-regulating-Kinase 1</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AUF1	<i>AU-Rich Element RNA-Binding Protein</i>
BH	Bcl-2-Homologie Domäne
bp	Basenpaar
BrdU	5'-bromo-2'-deoxyuridin
BrU	5'Bromouridine 5'-triphosphate
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
Cal	Calreticulin
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i> : Cyclin-abhängige Kinase
CDK-I	CDK-Inhibitor
Chk	<i>Checkpoint-Kinase</i>
CHX	Cycloheximid
CIP	<i>CDK-interacting protein</i>
CMV	Humaner Cytomegalovirus
CRC	<i>colorectal carcinoma</i>
CTD	C-terminale regulatorische Domäne
CUGBP1	<i>CUG triplet repeat RNA-binding protein</i>
DBD	DNA-bindende Domäne
DD	<i>death domain</i>
DDK1	<i>Dickkopf-related protein 1</i>
DDR	<i>DNA damage response</i> : DNA-Schädigungs-induzierte Signalwege
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DISC	<i>death induced signaling complex</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
DR	<i>death receptor</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELAVL	<i>embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila like</i>
EMT	epithelialer-mesenchymaler Transformation
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain-containing protein</i>



---

FasR	Fas-Rezeptor
G <sub>1</sub> -Phase	<i>gap</i> 1-Phase
G <sub>2</sub> -Phase	<i>gap</i> 2-Phase
Gy	Gray
h	Stunde
HDM2	<i>Human double minute 2 protein</i>
HDMX	<i>Human double minute X protein</i>
HITS-CLIP	<i>High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation</i>
hnRNP	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
HNSCC	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>
Hsp90	<i>Heat shock-Protein-Komplex 90</i>
HuD	Hu-antigen D
HuR	Hu-antigen R
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IL	Interleukin
IL-10	Interleukin-10
IP	Immunpräzipitation
IR	Ionisierende Röntgenstrahlung
IRF-9	<i>interferon regulatory factor-9</i>
ISGF3	interferon-stimulated gene factor 3
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KH	K-homology
KIP	<i>kinase-inhibitory protein</i>
KO	<i>Knock-Out</i>
L	<i>Linker</i>
LB	Luria Broth
LDH	Lactatdehydrogenase
LDLR	<i>low-density lipoprotein receptor</i>
lncRNA	long-non-coding RNA
LPS	Lipopolysaccharid
mA	milliAmpere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKAPK	MAPK-aktivierte Proteinkinase
MAPK-I	MAPK-Inhibitor
MEK1/2	MAPK/ERK Kinase1 und 2
min	Minute(n)
miRNA/miR	<i>microRNA</i>
MKK	MAPK-Kinase
MKKK	MAPK-Kinase-Kinase

---

MLTK	<i>MLK-like mitogen-activated protein triple kinase</i>
MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilisation</i> : Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRBP	messengerRBP
mRNAs	messenger-RNAs
Msi-1	Musashi-1
NaCl	Natriumchlorid
ncRNA	nicht-codierende RNA
NES	Nukleare Exportsequenz
Nfy $\alpha$	<i>nuclear transcription factor-Y alpha</i>
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
NLS	Nukleare Lokalisierungssequenz
ORF	Open reading frame
P/S	Penicillin/Streptomycin
PCBP1/CP1	<i>Poly-C-binding protein 1</i>
PCBP2	<i>Poly-C-binding protein 2</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> : Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidium-Iodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRB	Hyperphosphoryliertes RB
PRR	Prolin-reiche Region
PTM	post-translationale Modifikation
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative PCR
RB	Retinoblastom-Protein
RBD	RNA-bindende Domäne
RBM	<i>RNA binding motif</i>
RBP	RNA-bindendes Protein
RING	<i>really interesting new gene</i>
RIP	RNA-Immunpräzipitation
RISC	<i>RNAi-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNP	Ribo-Nukleo-Protein
RPL26	<i>Ribosomal protein L26</i>
RREB1	<i>Ras-responsive-element-binding protein 1</i>
RRM	<i>RNA-recognition motif</i>
RSK1	p90-ribosomale S6 Kinase
RT	Raumtemperatur

---

s.	siehe
S6K1	p70 S6 Kinase 1
SAHF	Seneszenz-assoziierte Heterochromatin-Foci
SAPK	<i>stress-activated phospho-kinase</i>
SASP	Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp
SA- $\beta$ -Gal	Seneszenz-assoziierte $\beta$ -Galaktosidase
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> : Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
siRNA	<i>small-interfering RNA</i>
S-Phase	Synthese-Phase
STAT1/2/3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1/2/3</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TADD	<i>TNFR-associated death domain-containing protein</i>
tBid	<i>truncated Bid</i>
Thr	Threonin
TJP1	<i>tight junction protein 1</i>
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAILR	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tyr	Tyrosin
UTP	Uridintriphosphat
UTR	Untranslatierte Region
WAF1	<i>wild-type p53-activated fragment 1</i>
Wisp39	<i>WAF-1/CIP-1 stabilizing protein 39</i>
wt	Wild-typ
z.B.	zum Beispiel
ZF	Zink-Finger

## 7.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. R. U. Jänicke für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit im Labor für Molekulare Radioonkologie durchzuführen und für die Bereitstellung des interessanten Forschungsthemas, welches er zuverlässig und mit stetiger Mithilfe begleitet hat.

Bei PD Dr. S. Gould bedanke ich mich für die Übernahme der Aufgabe als Zweitgutachter. Mein herzlicher Dank geht an Dr. D. Sohn für die allgemeine fachliche Unterstützung, für Hilfestellung bei der Versuchsplanung und experimentellen Problemen, für seinen Rat bei der Anfertigung von Präsentationen und dieser schriftlichen Ausarbeitung, und für sein stets offenes Ohr.

Besonders bedanke ich mich bei Alina Reese, Christine Hachmann und Judith Neuwahl für die Unterstützung und freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor und die angenehme Atmosphäre im Schreibraum, sodass man nicht nur konzentriert seiner Arbeit nach gehen konnte, sondern auch immer Gespräche über die alltäglichen Probleme des Labors möglich waren.

Auch möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Medizin für die Bereitstellung ihrer Geräte und der fachlichen Hilfe auf dem kurzen Dienstweg bedanken sowie für die freundschaftliche Unterhaltung in der Mittagspause und auch nach der Arbeitszeit.

Mein Dank gilt außerdem Jana Deitersen und Paul Baran für inhaltliche und sprachliche Korrektur.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich während der Bearbeitung meiner Promotion unentwegt auf allen möglichen Wegen unterstützt hat und auf deren Hilfe ich mich jederzeit verlassen konnte.