

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Hubert Kübler

Der Einfluss von bub1b und p53 auf den Zellzyklus sowie die Sensitivität
gegenüber Docetaxel

–

Untersuchungen am Mausmodell und an murinen embryonalen
Fibroblasten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Philipp Schweinfurth
aus Karlsruhe

Würzburg, Juli 2018



Referent: Prof. Dr. med. Elmar Gerharz

Korreferent: N.N.

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: N.N.

Der Promovend ist Arzt.

MEINER FAMILIE

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	- 1 -
1.1	Karzinogenese.....	- 1 -
1.2	Zellzyklus.....	- 2 -
1.3	Aneuploidie und chromosomale Instabilität	- 2 -
1.4	Mitotischer Spindel-Checkpoint (MSC).....	- 3 -
1.4.1	Mitotischer Spindel-Checkpoint (MSC) in der Tumorneogenese.....	- 5 -
1.4.2	Regulierung des mitotischen Spindel-Checkpoints (MSC) durch Tumorsuppressoren	- 5 -
1.4.3	Das Gen bub1b	- 6 -
1.5	Das Gen p53.....	- 6 -
1.5.1	Die p53 defiziente Maus.....	- 6 -
1.6	Docetaxel	- 7 -
1.6.1	Einfluss von Docetaxel auf den mitotischen Spindel-Checkpoint (MSC) in Tumoren.....	- 7 -
2	FORSCHUNGSFRAGE	- 9 -
3	TIERE, MATERIAL UND METHODEN	- 11 -
3.1	Tiere.....	- 11 -
3.1.1	Mauslinien	- 11 -
3.1.2	Maushaltung	- 11 -
3.2	Material.....	- 12 -
3.2.1	Geräte.....	- 12 -
3.2.2	Spezielle Software und Datenbanken.....	- 13 -
3.2.3	Chemikalien und Biochemikalien	- 13 -
3.2.4	Nährmedien	- 14 -
3.2.5	Puffer und Lösungen	- 14 -
3.2.6	Enzyme	- 14 -
3.2.7	Molekularbiologische Kits	- 15 -
3.2.8	DNA Standard	- 15 -
3.2.9	Primer	- 15 -

3.2.10	Gel	- 15 -
3.3	Methoden	- 16 -
3.3.1	Genotypisierung der Mäuse	- 16 -
3.3.2	Verpaarung	- 17 -
3.3.3	Sektion der Tiere und Tumorbestimmung	- 19 -
3.3.4	Gewinnung muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs)	- 19 -
3.3.5	Genotypisierung der embryonalen Fibroblasten (MEFs)	- 20 -
3.3.6	<i>in vitro</i> -Untersuchungen in Primärkultur	- 20 -
3.3.6.1	Zellkultur	- 20 -
3.3.6.2	Docetaxel-Titration	- 21 -
3.3.6.3	Zellzahlanalysen	- 22 -
3.3.6.4	Zellzyklusanalysen	- 22 -
3.3.7	Statistische Methoden	- 23 -
4	ERGEBNISSE	- 24 -
4.1	Überleben der Knockout-Mäuse abhängig vom <i>bub1b</i> - und <i>p53</i> -Genotyp	- 24 -
4.2	Zellzahlanalysen muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs) in Primärkultur abhängig vom <i>bub1b</i> - und <i>p53</i> -Genotyp	- 27 -
4.3	Zellzahlanalysen muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs) in Primärkultur abhängig vom <i>bub1b</i> - und <i>p53</i> -Genotyp nach Behandlung mit Docetaxel	- 29 -
4.4	Zellzyklusanalysen muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs) in Primärkultur abhängig vom <i>bub1b</i> - und <i>p53</i> -Genotyp	- 30 -
4.5	Zellzyklusanalysen muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs) in Primärkultur abhängig vom <i>bub1b</i> - und <i>p53</i> -Genotyp nach Behandlung mit Docetaxel	- 32 -
5	DISKUSSION	- 41 -
5.1	Die Rolle von <i>bub1b</i> und <i>p53</i> in der Embryogenese eines Mauskollektivs	- 41 -
5.2	Einfluss der Heterozygotie für <i>bub1b</i> auf das Überleben eines Mauskollektivs	- 42 -
5.3	Einfluss der Homozygotie für <i>p53</i> auf das Überleben eines Mauskollektivs	- 42 -

5.4	Tumorgenese in einem für bub1b heterozygoten und p53 homozygoten Mauskollektiv	- 43 -
5.5	Einfluss des Genotyps für bub1b und p53 auf die Proliferation von primären murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs).....	- 44 -
5.6	Verhalten von primären murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) in Abhängigkeit des Genotyps für bub1b und p53 nach Docetaxel-Behandlung.....	- 45 -
5.7	Die Kombination von Heterozygotie für bub1b und Homozygotie für p53	- 46 -
5.8	Klinische Relevanz von bub1b und p53 sowie deren Kombination in der Tumorentstehung und -therapie.....	- 47 -
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	- 49 -
7	LITERATURVERZEICHNIS	- 51 -
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	- 58 -
9	TABELLENVERZEICHNIS	- 60 -

1 EINLEITUNG

Tumorerkrankungen sind bereits jetzt eine der größten Herausforderungen der modernen Medizin. Angesichts der weiter fortschreitenden Überalterung insbesondere westlicher Gesellschaften ist darüber hinaus von einer weiteren Inzidenzsteigerung auszugehen¹. Daher ist es unverändert von hohem wissenschaftlichem sowie volkswirtschaftlichem Interesse, die Entstehung von Tumoren weiterhin intensiv zu erforschen, um sie besser verstehen und effektivere Behandlungskonzepte entwickeln zu können.

1.1 Karzinogenese

Die Entstehung von soliden Tumoren wird heute durch das Mehrstufenmodell erklärt², welches sich in Initiation, Promotion und Progression unterteilt³.

In der Initiationsphase kommt es z.B. durch ein Karzinogen zu einer Mutation in einem Gen einer Zelle, welche im Genom persistiert, wenn es nicht zu einer Reparatur der DNA oder zur Einleitung der Apoptose kommt.⁴

Durch einen in der Promotionsphase ausgelösten Wachstumsreiz, der eine unterschiedliche Quelle haben kann, beginnt die Proliferation der mutierten Zelle. Während der Proliferation wird die mutierte und instabile DNA an die Tochterzellen weitergegeben, womit das Risiko für weitere Mutationen auch in Tumor-suppressorgenen erhöht wird. Es entsteht so bei konstantem Wachstumsreiz ein präneoplastisches Stadium der mutierten Zellen, welche organbegrenzt wachsen und nicht metastasieren. Grundsätzlich ist dieses Stadium bei fehlendem Wachstumsreiz reversibel, da sich die imitierten Zellen dann nicht mehr vermehren können.⁴

Schließlich bedingen in der Progressionsphase sowohl weitere Mutationen in Tumorsuppressorgenen als auch die Umwandlung von Proto-Onkogenen in Onkogene die maligne Transformation der Zelle. Die Zelle teilt sich nun stetig auch ohne Wachstumsreiz und ist immortal. Es kann eine Tumormasse aufgebaut werden und die Zellen entdifferenzieren sich weiter. Des Weiteren wachsen sie verdrängend und können metastasieren.⁴

1.2 Zellzyklus

Der Zellzyklus beschreibt den Zeitraum zwischen zwei Zellteilungen einer eukaryoten Zelle und ist in Phasen unterschiedlicher Aktivität eingeteilt. Da sich bei einer Zellteilung (Mitose oder M-Phase) der in der Replikation duplizierte DNA-Gehalt einer Zelle jeweils auf die beiden Tochterzellen halbiert, muss er sich bis zur nächsten Teilung in der Synthese- oder S-Phase wieder verdoppeln. Die Phasen zwischen M- und S-Phase werden als Gap-Phasen (G_1 und G_2) bezeichnet.⁵

Die einzelnen Phasen der Mitose sowie der Zeitraum, in dem der mitotische Spindel-Checkpoint (MSC) aktiv ist, sind in Abbildung 1 dargestellt.

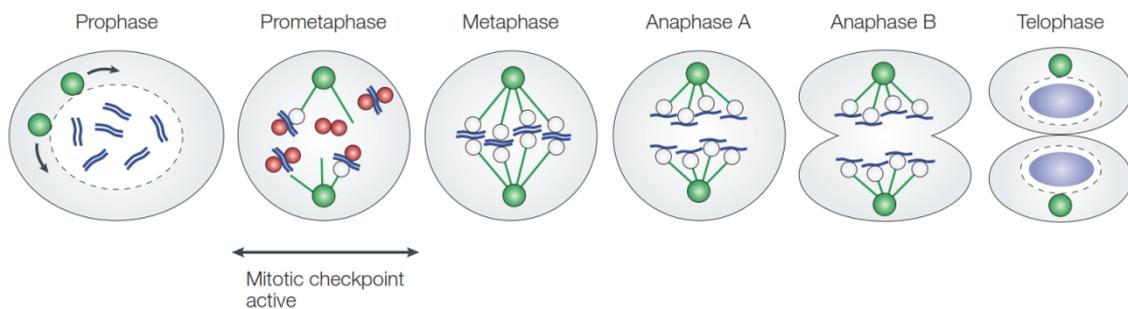


Abbildung 1 Konzertierter Ablauf der Mitosephase und Einflussbereich des mitotischen Checkpoints⁶

Das in der vorliegenden Arbeit genauer betrachtete Gen *bub1b* codiert für einen Teil des multimeren Proteinkomplexes (Siehe Abbildung 2), der den in der Prometaphase aktiven MSC kontrolliert.

1.3 Aneuploidie und chromosomale Instabilität

Die Aneuploidie ist eine Chromosomenaberration bei der einzelne Chromosomen zusätzlich zum üblichen Chromosomensatz, in Eukaryoten sind es 46 Chromosomen, vorhanden sind oder fehlen. Liegt keine Aneuploidie vor, nennt man diesen Zustand Euploidie. In Tumorzellen liegt überproportional häufig eine Aneuploidie vor.⁷

Eine Aneuploidie kann auf mehrere Ursachen zurückgeführt werden, die im Folgenden beispielhaft aufgeführt werden:

- Aberrante Mitose als Ursache von Polyploidisierung durch z.B. Zell-Zell-Fusion oder Defekten in der Duplikation der Zentromere^{8,9}

- Defekte bei der Kohäsion der Chromosomen, die durch die Protease, hier die Separase, reguliert wird, welche wiederum von Securin inhibiert wird. Eine Inaktivierung dieser Enzyme kann daher zum Chromosomenverlust führen.¹⁰⁻¹²
- Insuffiziente Verbindung der Chromosomen an den Mikrotubuli des Spindelapparates, durch z.B. mehrfaches Anhaften von Mikrotubuli an einem Kinetochor beider Pole¹³
- Defekte im MSC, sodass die Einleitung der Anaphase beginnt, bevor alle Chromosomen suffizient mit dem Spindelapparat verbunden sind⁶

Chromosomeninstabilität tritt insbesondere dann auf, wenn es zu Mutationen in Genen kommt, die für DNA-Reparaturproteine codieren. Durch diese Mutationen kommt es zu einer mangelhaften Reparatur der Gendefekte und daher unter anderem zu Chromosomenabbrüchen. Dies hat in den betroffenen Zellen eine erhöhte Rate von Translokationen, Inversionen und Deletionen zur Folge.¹⁴

1.4 Mitotischer Spindel-Checkpoint (MSC)

In der Zellbiologie bezeichnet ein Checkpoint einen Kontrollpunkt dessen Mechanismus den korrekten zeitlichen und biochemischen Ablauf des Zellzyklus und seiner Prozesse reguliert.¹⁵

Ursprünglich sah man die Aktivierung eines Checkpoints im Zellzyklus als Reaktion auf eine zelluläre Fehlfunktion. Heutzutage geht man jedoch davon aus, dass Check-points integrale Bestandteile von physiologischen biochemischen Abläufen im Zell-zyklus sind.¹⁶

So beschreibt der MSC einen Mechanismus, der den zeitlichen biochemischen Ablauf der Mitose mit der Anheftung der Kinetochore in der Prometaphase an den mitotischen Spindelapparat koordiniert¹⁶. Dies erfolgt sowohl durch die Regulierung der Befestigung der Kinetochore am Spindelapparat als auch durch die von den Spindeln an den Kinetochoren ausgeübte Spannung¹⁷.

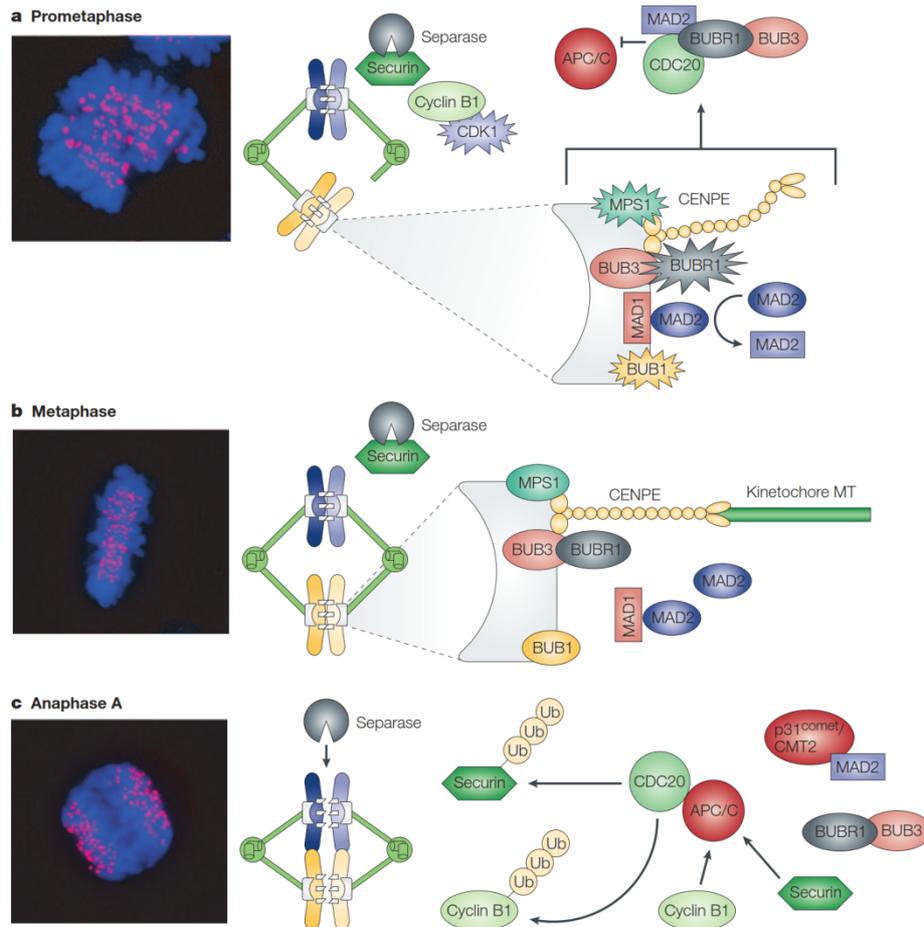


Abbildung 2 Schematische Darstellung des Spindel-Checkpoint (MSC) und der beteiligten Proteine in Abhängigkeit des Zellzyklus⁶: Die Kinetochore sammeln sich in der Prophase bzw. frühen Prometaphase (a). Jedes Paar der Schwester-Kinetochoren bindet an den Mikrotubuli an, welche sich daraufhin dehnen (b). Der darauffolgende Signalweg leitet die Anaphase ein (c).

Bei Vorliegen eines einzigen ungebundenen Kinetochors wird der MSC aktiviert und somit der Eintritt der Zelle in die Anaphase der Mitose verzögert^{18,19}.

Der MSC bindet dabei am „Anaphase-Promoting-Complex/Cyclosome“ (APC/C), eine Ubiquitinligase, welche über eine Prozesskaskade mit Hilfe des Aktivators CDC20^{20,21} die Trennung der Schwesterchromatide und den Abschluss der Mitose steuert²²⁻²⁴.

Der aktive MSC verhindert durch Inhibierung der durch CDC20 vermittelten Aktivierung von APC die Trennung der Schwesterchromatide (siehe Abbildung 2)¹⁹.

Einzelne Proteine des MSC, wie BUB1 und BUB3 (budding uninhibited by benzimidazole), die Proteine MAD1, MAD2, MAD3 (mitotic arrest deficient) sowie das Protein MPS1 (monopolar spindle), wurden erstmals in Hefen identifiziert²⁵⁻³⁰.

Homologe Gene kommen auch in Vertebraten vor und kodieren ebenfalls die Proteine MAD1, MAD, BUB1, BUB1B und BUB3 des MSC³¹⁻³⁵. Neben diesen Kernkomponenten konnten mittlerweile weitere Faktoren mit direkter Beteiligung am MSC identifiziert werden, z. B. die Gene cenpe³⁶, zw10 und rod³⁷.

1.4.1 Mitotischer Spindel-Checkpoint (MSC) in der Tumorneogenese

Während der MSC aktiviert ist, befindet sich der Zellzyklus vorübergehend in Arrest. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, welche Folgen ein Funktionsverlust der beteiligten Proteine des MSC für die betroffenen Zellen hat. Dabei führte die Inaktivierung von z.B. BUB1B durch Mikroinjektion spezifischer Antikörper im Experiment zum Eintreten der Zelle in die Anaphase, obwohl die Chromosomen aufgrund des Funktionsverlustes des MSC nicht mit dem Spindelapparat verbunden waren.^{34,38}

In einem weiteren Mausmodell war eine Reduktion der Proteinexpressionslevel für die Gene des MSC durchaus mit einem Überleben vereinbar, wenngleich eine vermehrte Aneuploidie auftrat und vermehrt Malignome beobachtet wurden.³⁹⁻⁴²

In weiteren tierexperimentellen Studien zur Funktion von bub1b trat jedoch bei einer kompletten Ablation des entsprechenden Gens bub1b in Mäusen Apoptose embryonaler Zellen auf, was zu früher embryonaler Letalität von bub1b defizienter Mäusen führte.⁴³

Eine verminderte Expression von Genen, welche für Proteine des MSC codieren, könnte daher durchaus Anteil an der Initiation und Progression von Malignomen haben. Jedoch kann davon ausgegangen werden, dass ein vollständiger Verlust der Funktionalität des MSC einer malignen Transformation eher hinderlich ist.⁴⁴

1.4.2 Regulierung des mitotischen Spindel-Checkpoints (MSC) durch Tumorsuppressoren

Zahlreiche Tumorsuppressoren und Onkogene regulieren die Mitose. Der Verlust von Tumorsuppressoren wie apc, p53, brca1 und brca2 sowie die Überexpression von Onkogenen wie mdm2, aurora (Aurorakinase A), ras, mycn können zur Instabilität der Mikrotubuli oder Amplifikation der Zentromere führen.^{9,45-47}

p53 reguliert den MSC durch Transkription des Proteins MAD1L1. Jedoch wurde sowohl ein Anstieg, als auch eine Reduzierung der Expression des Proteins MAD1L1 in Abhängigkeit der Genaktivierung festgestellt.^{48,49}

Kienitz et al. beschreiben, dass die Expression von MAD1L1 durch eine Mutation von p53 verstärkt wurde. Allerdings blieb eine Analyse der Aktivität des MSC in dieser Arbeit aus. Interessanterweise zeigte bereits eine Halbierung des Gehaltes von MAD1 eine Verminderung der Aktivität des MSC, was eine Chromosomeninstabilität bedingt.⁵⁰

1.4.3 Das Gen bub1b

Bub1b ist das Gen, welches unter anderem für die Kinase BUB1B kodiert. Diese Kinase ist, wie oben beschrieben, ein Teil des MSC und spielt bei der Regulation der Chromosomenteilung eine entscheidende Rolle.⁵¹

Die Kinase befindet sich während der Mitose am Kinetochor und ist an der Inhibierung des „Anaphase-Promoting-Complex/Cyclosome“ (APC/C) beteiligt. Dieser Komplex wiederum verzögert und steuert die Einleitung der Anaphase und sorgt für eine geregelte Teilung der Chromosomen.⁵²

1.5 Das Gen p53

P53 ist das Gen, welches für das Protein P53 kodiert. Der humane Tumorsuppressor P53 reguliert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose (des programmierten Zelltods) oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Aufgrund dieser Eigenschaft wird p53 in der Literatur als „Wächter des Genoms“ bezeichnet.⁵³

Die besondere medizinische Bedeutung besteht in der Tatsache, dass in bis zu 50 % aller menschlichen Tumoren p53 mutiert ist⁵⁴. Der Verlust der Funktion von p53 als Tumorsuppressor spielt somit eine kritische Rolle bei der Entstehung von Krebs.

1.5.1 Die p53 defiziente Maus

Nachdem 1989 das Gen p53 als Tumorsuppressor sicher identifiziert wurde, wird schon 1996 die p53 defiziente Maus als Modell für grundlegende und weiterführende Studien

in der Krebsforschung beschrieben. Auch wurde die erhöhte embryonale Letalität weiblicher, für p53 homozygoter Tiere aufgrund von Neuralrohrdefekten beobachtet. So wurden die erhöhte Inzidenz für Tumore homozygoter und heterozygoter Tiere und die damit einhergehende erhöhte Letalität sowie die Unterschiede in der Tumorverteilung gut beschrieben. Sämtliche homozygoten Tiere entwickeln nach etwa 10 Monaten einen Tumor, bei den heterozygoten Tieren sind es ca. 90% nach 24 Monaten, während die wildtypischen Tiere nach 24 Monaten in weniger als 25% der Fälle einen Tumor entwickeln. Bei den für p53 homozygoten Tieren treten in weit über der Hälfte der Fälle Lymphome auf, an zweiter Stelle stehen Weichteilsarkome, die restlichen Entitäten sind zu vernachlässigen. Bei den heterozygoten Tieren bilden sich in erster Linie Osteosarkome und an zweiter Stelle Lymphome und Weichteilsarkome in nahezu gleicher Anzahl.⁵⁵

1.6 Docetaxel

Docetaxel gehört zur Gruppe der Taxane und ist ein halbsynthetisches Spindelgift, das aus der europäischen Eibe gewonnen wird. Es bindet an die Mikrotubuli des Spindelapparates und stabilisiert diesen, sodass es zur Aktivierung des MSC kommen kann. Dadurch kommt es zu einem Arrest des Zellzyklus in der Mitose. Die Anaphase kann nicht eingeleitet werden und es folgt die Apoptose der Zelle.⁵⁶ Allerdings ist der Schritt von der verlängerten Aktivierung des MSC zur Apoptose noch nicht hinreichend geklärt.

1.6.1 Einfluss von Docetaxel auf den mitotischen Spindel-Checkpoint (MSC) in Tumoren

Docetaxel gehört zu den traditionellen Spindelgiften und führt bei kompletter Inhibierung des MSC zum Zelltod. Bei Tumorzellen führt allerdings das genaue Gegenteil dieses Effektes zum Zelltod. So zeigte allein die Reduzierung der intrazellulären Konzentration der Proteine des MSC MAD1 und BUB1B auf unter 10% der wildtypischen Konzentration in verschiedenen Tumorzelllinien eine komplette Inaktivierung des MSC. Daraus resultierten massive Chromosomenschäden während der Mitose, die nach zwei bis sechs Zellteilungen in der Apoptose endeten^{57,58}. Die Halbierung der Aktivität von BUB1B hat eine suffiziente Inhibierung des MSC zur Folge und führt folglich zum

Zelltod⁵⁷. Diese Effekte sind mit der embryonalen Letalität von Mäusen vereinbar, die homozygot für ein Gen des MSC sind und zeigen, dass Genmutationen in Tumorzellen den Ablauf der Signalkaskade des MSC schwächen können^{6,59}.

Der Ansatz, Tumorzellen durch Inhibierung des MSC zu bekämpfen, erhöht gleichzeitig das Risiko für Aneuploidie, welche die Tumorgenese in gesunden Zellen steigert, wenn die Inhibierung unvollständig ist. Es ist bislang auch nicht bekannt, ob die Apoptose durch Inhibierung des MSC tumorzellenspezifisch ist.⁶

2 FORSCHUNGSFRAGE

Der Einfluss des „Spindel-Checkpoint“ Gen *bub1b* auf die Entwicklung und Progression von Tumoren ist nicht eindeutig geklärt. Da eine reduzierte Expression von *bub1b* mit der Entstehung von Tumoren assoziiert wurde, konnte eine tumorsuppressive Funktion vermutet werden. *Bub1b* Defizienz führt aber zu Letalität von Zellen. Defekte im mitotischen Spindel Checkpoint (MSC), in dem *bub1b* eine wesentliche Rolle einnimmt, wurden wiederum mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber verschiedenen Therapeutika in Verbindung gebracht. Um die Bedeutung von *bub1b* als mögliches Tumorsuppressoren und seinen Einfluss auf die Sensibilität gegenüber dem Zytostatika Docetaxel zu untersuchen, soll ein zweigeteilter Ansatz verfolgt werden.

- Zunächst soll ein *bub1b* / *p53* transgenes Mausmodell etabliert werden, um den Einfluss von *bub1b* auf die Tumorgenese *in vivo* zu untersuchen. Hierzu erfolgen Überlebensanalysen von Tieren unterschiedlichen Genotyps der genannten Gene. Mit Hilfe dieser Analysen soll untersucht werden, ob die Entwicklung und Progression von Tumoren in *p53* defizienten Tieren durch eine *bub1b* Heterozygotie verändert wird.

In einem zweiten Projektteil soll nach Etablierung und Kultivierung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) der unterschiedlichen *bub1b* / *p53* Genotypen folgende Analysen *in vitro* erfolgen:

- Bestimmung der absoluten Zellzahlen bzw. der Proliferation mittels Neubauer-Zählkammer in Abhängigkeit vom zellulären Genotyp und der Dauer der Docetaxel-Behandlung jeweils im Vergleich zu einer Kontrollgruppe um eventuelle Resistenzen bzw. Proliferationsvorteile aufzeigen zu können.
- Abschließende Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie in Abhängigkeit vom zellulären Genotyp und der Dauer der Docetaxel-Behandlung, um die Rolle von *bub1b* für die Aktivierung des Spindel-Checkpoints und der Polyploidie zu verdeutlichen.

Von besonderem Interesse bei den Versuchen ist der Genotyp mit Heterozygotie für bub1b und Homozygotie für p53. Mit Hilfe dieser Experimente soll untersucht werden, inwieweit sich eine bub1b Heterozygotie in p53 defizienten MEFs auf die Proliferation, den Zellzyklus und der Aktivierbarkeit des MSC auswirken.

3 TIERE, MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiere

3.1.1 Mauslinien

Für die Versuche wurden Tiere des Stammes C57BL/6, eine seit 1921 bestehende Labormauslinie, verwendet. Dieser Stamm zeichnet sich durch ein relativ stabiles Gruppen- und Zuchtverhalten aus. Die aus ihm gezüchteten Tiere, gehören mit zu den ersten Säugetieren, deren komplettes Genom analysiert und veröffentlicht wurde. Deshalb wird dieser Stamm sehr häufig für Modelle menschlicher Erkrankungen in genetisch veränderten Mäusen verwendet.

In unseren Versuchen hatten die Mäuse zusätzlich einen Knockout für *bub1b* oder für *p53*. Die *p53* defizienten Mäuse (JAX stock #002101) wurden über The Jackson Laboratory, Bar Harbor USA bezogen. Die *bub1b* heterozygoten Mäuse lieferte „The Charles River Laboratory“, Wilmington USA.



Abbildung 3 Maus des Stammes C57BL/6 (Foto: The Jackson Laboratory, Bar Harbour, USA)

3.1.2 Maushaltung

Die Versuchsmäuse wurden in der Kleintierhaltung des Biozentrums Würzburg unter keimreduzierten und infektionskontrollierten Bedingungen gehalten. Bei Betreten des Mausstalls durch eine zugangskontrollierte Schleuse musste gemäß den Hygienemaßnahmen der Kleintierhaltung des Biozentrums nach hygienischer Händedesinfektion ein Kittel, sowie Handschuhe, Haarnetz und Mundschutz angelegt werden.

Trockenfutter und Trinkwasser war für die Versuchstiere frei zugänglich. Es bestand ein physiologischer Tag-Nacht-Rhythmus. Zur Differenzierung der Genotypen wurden die Mäuse nach Geburt am Ohr mittels Clip markiert und eine Stanze aus dem Ohrappen schmerzfrei zur Genotypisierung entnommen.

Nach Genotypisierung wurden die Mäuse entsprechend ihres Geschlechts getrennt, entsprechend ihres Genotyps verpaart und gegebenenfalls aufgrund von gestörtem Allgemeinbefinden, verursacht durch Tumorentwicklung, oder zum Zweck der Organentnahme und Zellgewinnung schmerzlos getötet. Die Tötung der Tiere erfolgte durch Genickbruch.

3.2 Material

3.2.1 Geräte

Für die Genotypisierung der Tiere und Zellen mittels PCR, für die Zellkultur, für die Zellzahlanalysen, die Zellzyklusanalysen sowie die Lagerung der Zellen und Proben wurden folgende Geräte verwendet:

- Thermocycler Primus 96plus (MWG-Biotech)
- Elektrophoresekammer (BIO-RAD)
- GELDOC XR System (BIO-RAD)
- Vortex Mixer (neoLab)
- Zentrifuge, Biofugeprimo (Heraeus)
- CO₂-Brutschrank CB 160 (Binder)
- Kühlschrank (7°C) (Liebherr)
- Tiefkühlschrank (-80°C) (Heraeus)
- Stickstofftank (Air Liquide)
- Neubauerzählkammer (Brand)
- Pipetten (Brand)
- Petrischalen 10cm (Sarstedt)
- Durchflusszytometer CA II (PARTEC)

3.2.2 Spezielle Software und Datenbanken

Folgende Softwareprogramme und Datenbanken standen für die PCR, für die Zellzyklusanalyse und für die Literaturrecherche zur Verfügung:

- QuantityOne 4.5.2 (BIO-RAD)
- NCBI Homepage (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
- Software Zellzyklus Analyse (PARTEC)

3.2.3 Chemikalien und Biochemikalien

Für die Genotypisierung der Tiere und Zellen mittels PCR, für die Zellkultur, für die Zellzahlanalysen, für die Zellzyklusanalysen sowie die Lagerung der Zellen und Proben wurden untenstehende Chemikalien und Biochemikalien benötigt:

- betaMercaptoethanol (Gibco)
- Trypsin EDTA 0,25% (Invitrogen)
- Pen/Strep 10000U/ml/10000µl/ml (Biochrom)
- Docetaxel 20mg/ml (Kabi)
- Tris (Merck)
- Borsäure (Merck)
- EDTA (Calbiochem)
- Glycerin (Roth)
- Bromphenolblau (Roth)
- Xylencyanol (Roth)
- Ethidiumbromid (Merck)
- Propidiumiodid 1mg/ml (Invitrogen)
- Natriumcitrat 38mM (Roth)
- Sarcosyl 10% (Merck)
- Chelex 100 (Merck)
- Deoxynucleotidtriphosphate (dNTP) (Merck)
- Magnesium (Roth)

3.2.4 Nährmedien

In der Zellkultur sowie zur Vorbereitung der Zellen für die Zellzyklusanalyse wurden folgende Nährmedien verwendet:

- DMEM High Glucose Medium (PAA)
- Fetales Kälberserum FCS 10% (PAA)
- MEM non-essential Amino Acid Solution (Gibco)

3.2.5 Puffer und Lösungen

Zur Vorbereitung der Zellen für die PCR und bei der PCR-Auswertung sowie in der Zellkultur wurden insgesamt fünf Puffer benötigt:

- Dulbecco's PBS (PAA)
- 10fach PCR-Puffer (Genaxxon)
- 5fach TBE Puffer
(108g Tris; 55g Borsäure; 50mL 0,5M EDTA pH 8,0 ad 2l dH₂O)
- 6fach Ladepuffer für Agarosegele
(30% Glycerin; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 0,2% EDTA; pH 8,0)
- Lysepuffer
(2,5ml Sarcosyl (10% in dH₂O), 1ml 5M NaCl, 2,5g Chelex 100 ad 50ml dH₂O)

3.2.6 Enzyme

Für die PCR und die Vorbereitung der Zellzyklusanalyse wurden drei Enzyme verwendet:

- Taq DNA Polymerase, rekombinant (Invitrogen)
- Proteinase K (Roche Diagnostics)
- RNase A (Promega)

3.2.7 Molekularbiologische Kits

Mit folgendem Kit wurde die PCR optimiert:

- Im-Prom-II Reverse Transcription System (Promega)

3.2.8 DNA Standard

In der PCR wurde der folgende DNA Standard verwendet:

- 100bp DNA Ladder, 1µg/µl (Invitrogen)

3.2.9 Primer

Die in der PCR zur Gentyisierung verwendeten Primer wurden von der Firma Biomers speziell für unsere Arbeitsgruppe erstellt.

Für die p53 defiziente Maus:

- W5 5'-aca gcg tgg tcc tta t-3' (Biomers)
- M5 5'-cta tca gga ccg ttg g-3' (Biomers)
- W3 5'-tat act cag acg gcc t-3' (Biomers)

Für die bub1b defiziente Maus:

- MAD-A 5'-gtc tct ggc ctc act ttt gc-3' (Biomers)
- MAD-B 5'-gcg ttg ttt tct gac agc ag-3' (Biomers)
- Hygro-2 5'-ggg tgg cgc tac cgg tgg at-3' (Biomers)

3.2.10 Gel

Das Agarose-Gel für die PCR wurde selbst gegossen.

- Agarose-Gel
(0,9g Agarose und 10µl Ethidiumbromid auf 100 ml TBE-Puffer)

3.3 Methoden

3.3.1 Genotypisierung der Mäuse

Für die Genotypisierung wurden die Schwanzenden der Mäuse verwendet. Sie wurden in 180µl Lysepuffer und 20µl Proteinase K bei 55°C über Nacht im Heizblock inkubiert. Die Reaktionslösung wurde am Folgetag für zehn Minuten auf 98°C zur Inaktivierung der Proteinkinase K erhitzt. Anschließend wurde die Lösung zehn Minuten lang bei 13000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand, der u.a. die genomische DNA enthielt, wurde für die anschließende PCR verwendet.

Für die PCR zur Detektion von p53 wurde folgender Ansatz für 50 µl mit drei Primern verwendet:

dH ₂ O		39,2 µl
Puffer 10		5 µl
MG		1,5 µl
dNTP		0,8 µl
Primer 1	W5	1,6 µl
Primer 2	M5	0,8 µl
Primer 3	W3	0,8 µl
TaqPoly		0,3 µl
gDNA		0,5 µl

Tabelle 1 Zusammensetzung des verwendeten PCR-Ansatzes zur Detektion von p53

Alle weiteren Arbeitsgänge der PCR wie Cycling und Elektrophorese wurden nach Angaben von The Jackson Laboratory ausführt. Sie wurden erstmalig durch Jacks e.a. veröffentlicht.⁶⁰

Für die PCR zur Detektierung von bub1b kam folgender Ansatz für 50µl mit drei Primern zum Einsatz:

dH ₂ O		39,7 µl
Puffer 10		4 µl
MG		1,5 µl
dNTP		0,8 µl
Primer 1	MADA	1,6 µl
Primer 2	MADB	0,8 µl
Primer 3	Hygro2	0,8 µl
TaqPoly		0,3 µl
gDNA		0,5 µl

Tabelle 2 Zusammensetzung des verwendeten PCR-Ansatzes zur Detektion von bub1b

Die weiteren Arbeitsschritte dieser PCR wurden nach Angaben von The Charles River Laboratory gemacht. Sie sind u.a. von Schmid et al. publiziert worden.⁵⁹

3.3.2 Verpaarung

Um Mäuse mit den geforderten Genotypen zu erhalten, wurden sie nach den untenstehenden Matrizen (Siehe Tabellen 3 und 4) verpaart, indem entsprechende Zuchttiere ausgesucht und zusammengesetzt wurden.

		bub1b		p53	
		+	-	+	+
bub1b	+	++	+ -		
	+	++	+ -		
p53	+			++	++
	-			+ -	+ -

Tabelle 3 Kreuzungsmatrix zweier für jeweils ein Gen (p53 bzw. bub1b) heterozygoten Knockout-Mäuse: Die Genotypen des Gens bub1b sind grün dargestellt, die für p53 rot.

		bub1b		p53	
		+	-	+	-
bub1b	+	++	+ -		
	-	+ -	--		
p53	+			++	+ -
	-			+ -	--

Tabelle 4 Kreuzungsmatrix zweier für beide Gene (p53 und bub1b) heterozygoten Knockout-Mäuse: Die Genotypen des Gens bub1b sind grün dargestellt, die für p53 rot. Der grau hinterlegte Genotyp ist letal.

Ein Vererbungsschema der Gene bub1b und p53 wird in Abbildung 4 wiedergegeben.

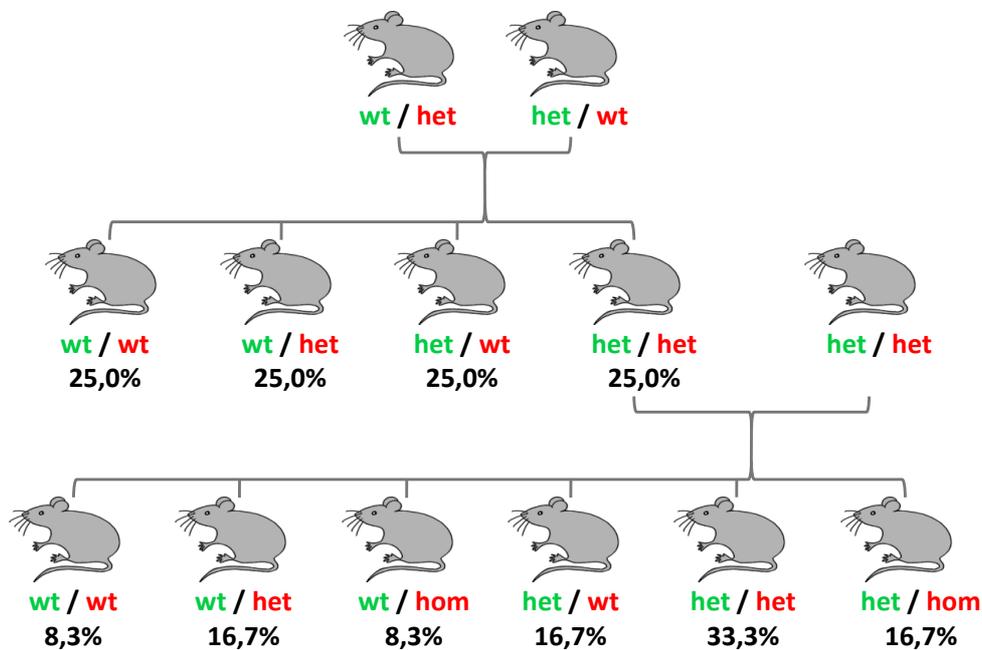


Abbildung 4 Vererbungsschema zweier unabhängiger Gene (bub1b / p53): Dargestellt ist ein Vererbungsschema ausgehend von zwei Tieren, die jeweils für eines der beiden Gene heterozygot sind. Die Vererbung des Gens bub1b ist grün dargestellt, die für p53 rot. Die Wahrscheinlichkeit für den resultierenden Genotyp nach Kreuzung ist in Prozent angegeben.

Aus Abbildung 4 geht hervor, wie unterschiedlich die Genotypen im Mauskollektiv verteilt sind. Da aus dem Kollektiv noch zusätzlich Tiere zur Gewinnung von MEFs entnommen wurden, ist offensichtlich, dass es nur wenige für p53 homozygote Tiere gab.

3.3.3 Sektion der Tiere und Tumorbestimmung

Die Tiere wurden täglich bzgl. ihres Gesundheitszustandes und Verhaltens kontrolliert. Bei Auffälligkeiten wie erhöhter Atemfrequenz, Gewichtsverlust, analer Blutabgang, makroskopischen Tumoren, Mobilitätseinschränkungen, Verhaltensauffälligkeiten (z.B. Aggressivität), Letalität etc. wurde das Tier aus dem Mausstall entnommen, moribunde Tiere wurden schmerzlos getötet. Anschließend erfolgte die standardisierte Sektion, die auch bei Tieren nach Ablauf des Beobachtungszeitraums durchgeführt wurde. Dabei wurde nach Fixierung des Tieres das Fell von den Muskelfasziën ab präpariert und insbesondere auf Weichteilsarkome, dermale, cervicale und buccale Lymphome kontrolliert. Danach erfolgte die Eröffnung des Thorax und Abdomens. Hierbei wurden die mesenterialen, retroperitonealen und mediastinalen Lymphknoten sowie der Thymus auf Lymphome untersucht. Im Anschluss erfolgte die Entnahme der abdominalen, retroperitonealen und thorakalen Organe sowie deren ausführliche Inspektion. Als Lymphom wurden Vergrößerungen der Lymphknoten und des Thymus von über 10% der Norm definiert. Alle weiteren Tumore waren eindeutig als Pathologien zu erkennen. Eine mikroskopische Kontrolle erfolgte stichprobenartig oder bei unklarer Entität. Eine Eröffnung des Schädels erfolgte nur bei unauffälligem thorakalem und abdominalem Befund sowie bei Verhaltensauffälligkeiten, die auf eine neurologische Ursache schließen ließen.

3.3.4 Gewinnung muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs)

Zunächst wurde ein Männchen zu einem Weibchen, beide bekannten Genotyps, gesetzt. Der Beginn einer Schwangerschaft des Weibchens wurde durch tägliche Kontrolle auf einen vaginalen Plug, als Zeichen einer in den letzten 24 Stunden stattgefundenen Befruchtung, festgestellt. Am 12. Tag der Schwangerschaft wurde das Muttertier schmerzlos getötet, um die Embryonen zu entnehmen. Nach Eröffnen des Abdomens und Präparation des Uterus wurden die Embryonen entnommen und sofort in eine Petrischale mit Nährmedium gelegt und durch Decapitation schmerzlos getötet. Anschließend wurde noch die abdominelle Organanlage (roter Punkt) mittels spitzer Pinzette unter einer Lupe entnommen. Die Köpfe und Organanlagen wurden lysiert und zur Genotypisierung verwendet.

Das restliche embryonale Gewebe wurde mit 1,5 ml Trypsin versetzt und für 5-10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 10min bei 1000U/min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Zur Kultivierung im Brutschrank wurde das Pellet in 3ml Nährmedium (siehe 3.2.4) gegeben.

3.3.5 Genotypisierung der embryonalen Fibroblasten (MEFs)

Zur Genotypisierung der MEFs wurde entsprechend der Typisierung der Mäuse vorgegangen (siehe 3.3.1), wobei hier anstelle der Ohrstanze der Kopf und die abdominale Organanlage als Ausgangsmaterial verwendet wurden.

3.3.6 *in vitro*-Untersuchungen in Primärkultur

3.3.6.1 Zellkultur

Die MEFs weisen ein adhärentes Zellwachstum auf. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 6% CO₂-Gehalt der Luft und 95% Luftfeuchtigkeit. Bei ca. 75% bis 90% Zelldichte (Konfluenz) der Petrischalen wurden die Kulturen untenstehenden Experimenten zugeführt, zur Erhaltung und Vermehrung der Zellen passagiert oder in einem Milliliter Nährmedium aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Versuchsreihen wurden MEFs entweder mit Nährmedium aufgetaut und gewaschen oder direkt aus den primären Passagen genommen. Sie wurden in Petrischalen ausgesät und entsprechend des Versuchsaufbaus behandelt, dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen sich zu Beginn der Versuche immer in der 3. bis 5. Passage befanden, um ein vergleichbares Proliferationsverhalten sicherzustellen.

Das für die Kultivierung, Passagierung und Transfektion der Zellen verwendete Nährmedium setzte sich wie folgt zusammen:

- DMEM, 500ml
- 10% FCS, 50ml
- Penicillin/Streptomycin, 5ml
- MEM non-essential Amino Acid Solution, 5ml
- betaMercaptoethanol, 500µl

Bei einem Zellbewuchs der Petrischalen von ca. 75% bis 90% wurde zunächst das Nährmedium abgesaugt und die Zellen mit ca. 5ml PBS-Puffer gewaschen. Durch Zugabe von 1,5ml Trypsin EDTA Lösung wurden die Zellen nach einer ca. 4-minütigen Einwirkzeit von der Oberfläche gelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (900U/min für 10min), der Überstand abgenommen und das Pellet entweder in flüssigem Stickstoff eingefroren oder nach Bestimmung der Zellzahl erneut in Nährmedium kultiviert.

Für die Zellzahlbestimmung wurde das Pellet in 100µl Nährmedium suspendiert und in einer Mikrotiter-Platte mit Trypanblau in einem Verhältnis von 1:10 oder 1:4 versetzt und daraufhin in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

3.3.6.2 Docetaxel-Titration

Aufbauend auf den vorhandenen Erfahrungen mit Nocadazol innerhalb der Arbeitsgruppe wurde eine Standarddosierung für die Behandlung von MEFs mit Docetaxel erarbeitet und festgelegt. Es wurden zunächst Zellen mit 20 mg/ml Docetaxel in den Verdünnungen von 1:500, 1:2000 und 1:5000 behandelt und bzgl. ihrer Proliferation untereinander und im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe beobachtet. Neben wildtypischen Zellen wurden auch Zellen, die heterozygot bzw. homozygot für die untersuchten Gene *bub1b* und *p53* waren, verwendet. Insgesamt zeigten die behandelten wildtypischen Zellen bei einer Verdünnung des Docetaxel von 1:2000, was einer Konzentration von 0,01 mg/ml entspricht, ein gewünschtes, nahezu gleiches Proliferationsverhalten im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Bei den heterozygoten bzw. homozygoten Zellen ergaben sich jedoch, ebenfalls erwünscht, schon leichte Unterschiede in der Proliferation. Daher wurde diese Verdünnung abschließend als Standard festgelegt.

Bei gleicher Dosierung von Docetaxel gab es sowohl zwischen unterschiedlichen Chargen eines Herstellers, als auch zwischen denen verschiedener Hersteller deutliche Unterschiede des Wachstumsverhaltens der Zellen. Aus diesem Grund wurde innerhalb eines Experiments immer nur dieselbe Charge eines Herstellers verwendet.

3.3.6.3 Zellzahlanalysen

Es wurden die verschiedenen Genotypen der MEFs mit einer Zellzahl von je 5×10^5 Zellen pro Petrischale in 10ml Nährmedium kultiviert. Pro Genotyp wurden eine Referenzkultur, sowie eine Versuchskultur, die mit 0,01 mg/dl Docetaxel versetzt wurde, angelegt. Dies entspricht $5 \mu\text{l}$ einer Ausgangskonzentration von 20 mg/ml in 10 ml Nährmedium. Die Kulturen wurden bis maximal 72 Stunden kultiviert. Bei einem Zellbewuchs von ca. 75% bis 90% wurden die Zellen passagiert und erneut mit Docetaxel versetzt. Die Anfangszellkonzentration betrug ca. 5×10^5 Zellen pro Petrischale.

3.3.6.4 Zellzyklusanalysen

Die MEFs wurden entsprechend Kapitel 3.3.6.1 kultiviert und mit Docetaxel versetzt. Zu bestimmten Zeitpunkten maximal aber nach 72 Stunden wurde einige Petrischalen der einzelnen Referenz- und Versuchskulturen entnommen, das Nährmedium abgesaugt und die Zellen gemäß Kapitel 3.3.6.1 behandelt und zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in Nährmedium gewaschen, erneut zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in $100 \mu\text{l}$ eiskaltem Ethanol tropfenweise aufgenommen und in Stickstoff eingefroren.

Ein bis zwei Stunden vor der Zellzyklusanalyse wurden das Pellet in 5ml PBS aufgetaut und gewaschen. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert, der Überstand entnommen und das gewaschene Pellet in $500 \mu\text{l}$ Natriumcitrat und $25 \mu\text{l}$ RNase A suspendiert. Nach Inkubation der Probe für 30 Minuten bei 37°C wurden $5 \mu\text{l}$ Propidiumiodid hinzugegeben und die Probe dem Durchflusszytometer zugeführt. Die Einstellungen, die Kalibrierung und Auswertungen am Durchflusszytometer erfolgten nach Angaben des Herstellers PARTEC.

Bei der Auswertung wurden die Zellen nach den Zellzyklusphasen, in denen sie sich zum Zeitpunkt der Analyse befanden, aufgeteilt. Hierzu wurden die Graphen der Phasenintervalle einzeln markiert. Die daraus resultierenden absoluten Zellzahlen der einzelnen Phasen wurden anschließend in Prozentwerte umgewandelt und in der Spalte „gated“ abgespeichert und wie untenstehend in den Abbildungen 10 bis 13 zu sehen, dargestellt. Allein diese Werte wurden für die späteren Datenanalysen herangezogen.

3.3.7 Statistische Methoden

Zur Berechnung von Wahrscheinlichkeiten und daraus resultierenden Signifikanzen wurden zum einen der t-Test und zum anderen der Chi-Quadrat-Test angewendet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Überleben der Knockout-Mäuse abhängig vom bub1b- und p53-Genotyp

Zunächst war von Interesse, ob sich die Heterozygotie für bub1b in einem p53 homozygoten (hom) sowie wildtypischen (wt) Kollektiv gegenüber einem jeweils für bub1b wildtypischem Kollektiv auf die Lebensdauer der Mauskollektive auswirkt. Hierzu wurden bub1b und p53 heterozygoten (het) Tieren verpaart und anschließend die Genotypen der Nachkommen mittels PCR bestimmt. Das Überleben einer Mauskolonie wurde über 100 Wochen kontrolliert, dabei wurden die unterschiedlichen Überlebensraten der Genotypen bub1b wt / p53 wt (Kontrollgruppe) und bub1b het / p53 wt sowie bub1b wt / p53 hom und bub1b het / p53 hom protokolliert.

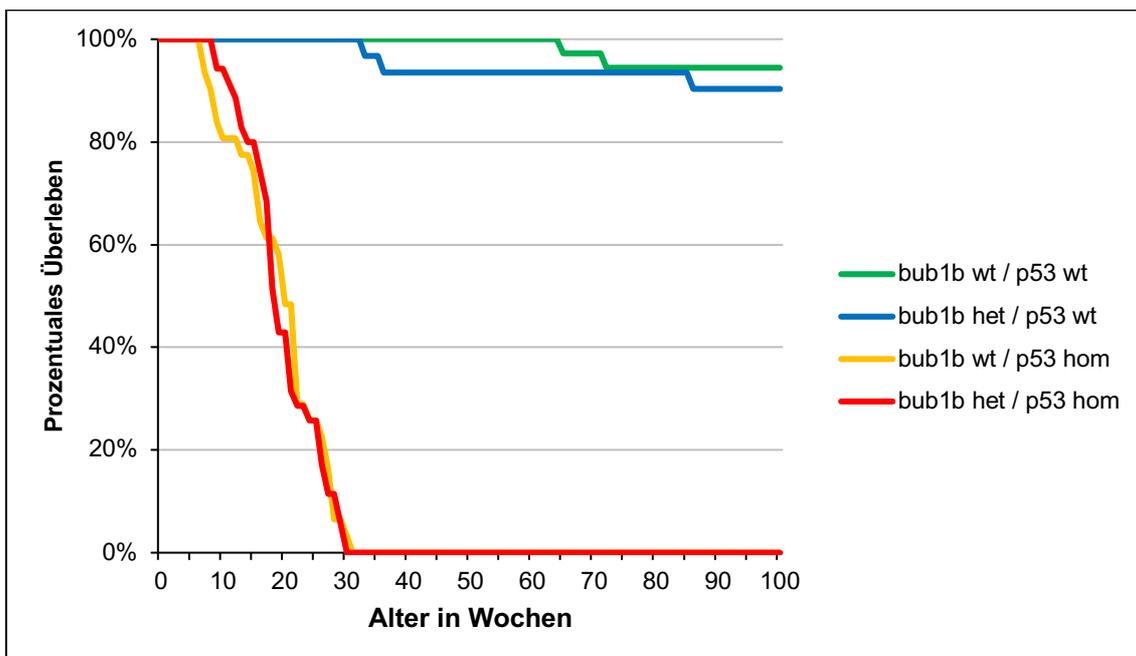


Abbildung 5 Genotyp-abhängiges Überleben von Mäusen der Genotypen bub1b wt / p53 wt, bub1b het / p53 wt, bub1b wt / p53 hom und bub1b het / p53 hom: Mäuse mit dem Genotypen bub1b wt / p53 wt (grüne Kurve, n=36) und bub1b het / p53 wt (blaue Kurve, n=31) zeigen ein signifikant längeres Überleben als Mäuse mit den Genotypen bub1b wt / p53 hom (orange Kurve, n=31) und bub1b het / p53 hom (rote Kurve, n=35).

Wie in Abbildung 5 dargestellt, zeigten die Genotypen bub1b wt / p53 hom und bub1b het / p53 hom ein signifikant niedrigeres Überlebensalter von durchschnittlich 19 bzw. 20 Wochen im Vergleich zu Tieren der Genotypen bub1b wt / p53 wt (Kontrollgruppe) und bub1b het / p53 wt, von denen zwei von insgesamt 36 bzw. drei von insgesamt 31 im Beobachtungszeitraum verstarben. Ein signifikanter Unterschied des Überlebensalters

zwischen den Tieren der Genotypen *bub1b wt / p53 hom* und *bub1b het/ p53 hom* sowie der Genotypen *bub1b wt / p53 wt* und *bub1b het / p53 wt* untereinander lässt sich nicht zeigen.

Nach Ablauf des Überwachungszeitraums bzw. einer präfinalen, schmerzfreien Tötung wurden Sektionen durchgeführt, um pathologische Veränderungen der einzelnen Versuchstiere festzustellen. In der wildtypischen Kontrollgruppe und bei den *bub1b* heterozygoten Mäusen wurden im Überwachungszeitraum keine Mäuse mit Tumoren beobachtet.

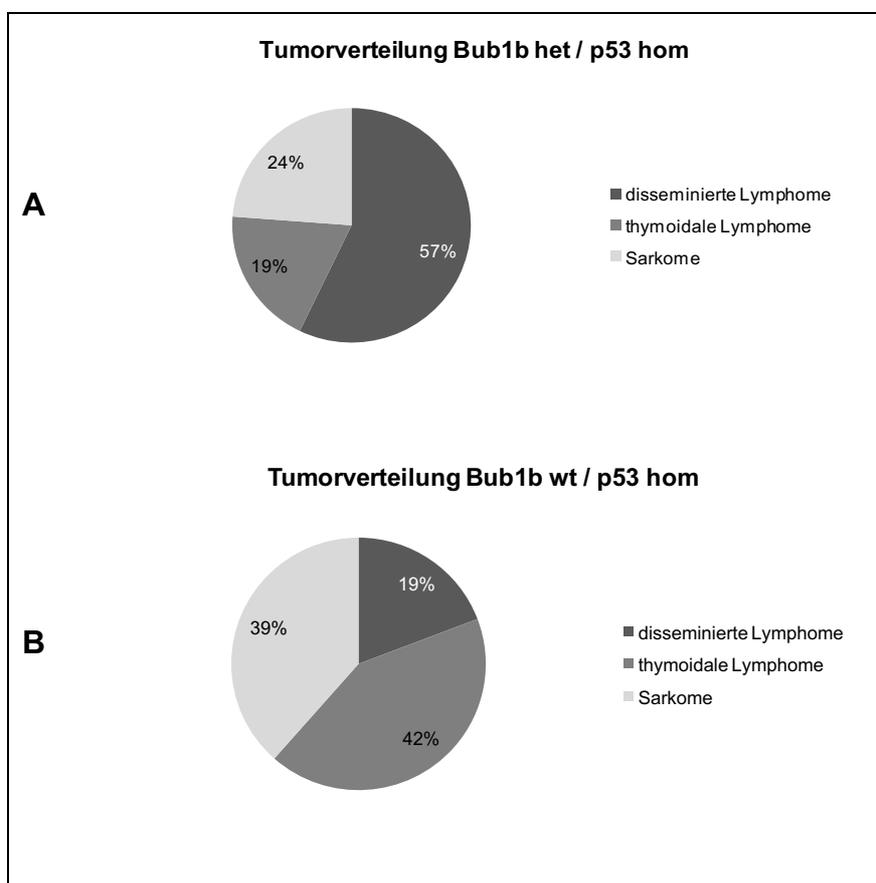


Abbildung 6 Genotyp-abhängiges Auftreten definierter Tumorentitäten (Lymphome und Sarkome) bei den untersuchten Mäusen mit Tumoren: Dargestellt sind die Ergebnisse für die Genotypen *bub1b het / p53 hom* (A) *bub1 wt/ p53 hom* (B).

Tumorentität \ Genotyp	Sarkome	Disseminierte Lymphome	Thymoidale Lymphome	Summe
bub1b wt / p53 hom	10	5	11	26
bub1b het / p53 hom	5	12	4	21
Summe	15	17	15	47

Tabelle 5 Tabellarische Darstellung der Anzahl der Tumorentitäten im Mauskollektiv: Die Anzahl der jeweiligen Tumorentitäten sind in Abhängigkeit der Genotypen dargestellt.

Wie in Abbildung 6 und Tabelle 5 wiedergegeben, sind hingegen in Mäusen der Genotypen bub1b wt / p53 hom und bub1b wt / p53 hom häufig Tumore festgestellt worden. Auch konnten in beiden Gruppen signifikante Unterschiede in den Häufigkeiten der verschiedenen Tumorentitäten beobachtet werden. (Chi-Quadrat-Tests, p-Wert = 0,025). So entwickelten Tiere des Genotyps bub1b het / p53 hom signifikante Abweichungen in der Häufigkeit der Tumore (Disseminierte Lymphom (57%) > Sarkome (24%) > thymoidale Lymphome (19%)). Im Vergleich hierzu zeigten Tiere des Genotyps bub1b wt / p53 hom am häufigsten thymoidale Lymphome (42%) gefolgt von Sarkomen (39%) und disseminierten Lymphomen (19%). Somit könnte Heterozygotie für bub1b in p53 defizienten Mäusen eine starke Zunahme von disseminierten Lymphomen bei gleichzeitiger Abnahme des Auftretens von thymoidalen Lymphomen verursachen.

Tumorentität \ Genotyp	Sarkome [Wochen]	Disseminierte Lymphome [Wochen]	Thymoidale Lymphome [Wochen]
bub1b wt / p53 hom	22	17	23
bub1b het / p53 hom	15	23	22
p-Wert	0,31	0,42	0,90

Tabelle 6 Tabellarische Darstellung der durchschnittlichen Lebensalter im Mauskollektiv: Die durchschnittliche Lebensdauer ist in Abhängigkeit der gezeigten Genotypen und der Tumorentitäten dargestellt.

Vergleicht man zusätzlich, wie in Tabelle 6 dargestellt, das Durchschnittsalter der Tiere zum Zeitpunkt des Auftretens der unterschiedlichen Tumorentitäten in Abhängigkeit der Genotypen bub1b wt / p53 hom und bub1b het / p53 hom, so zeigt sich aufgrund der ermittelten p-Werte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen. Dennoch fällt auf, dass Sarkome in Mäusen des Genotyps bub1b het / p53 hom früher auftreten, während sich disseminierte Lymphome im Mittel später entwickeln. Zusammenfassend kann aus diesen Untersuchungen geschlossen werden, dass Heterozygotie für bub1b in

p53 defizienten Mäusen eine verstärkte Genese von disseminierten Lymphomen, die zeitlich eine leicht verzögerte Entwicklung aufweisen, verursacht. Gleichzeitig führt die Heterozygotie für bub1b zur Abnahme von Sarkomen, die aber im Mittel früher auftreten.

4.2 Zellzahlanalysen muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs) in Primärkultur abhängig vom bub1b- und p53-Genotyp

Neben den Untersuchungen am Mausmodell wurden zur weiteren funktionellen Charakterisierung der oben betrachteten Genotypen primäre Zellkulturen von MEFs etabliert.

Nachdem aus zwölf Tage alten Embryonen MEFs gewonnen wurden, wurden ihre Genotypen mittels PCR bestimmt. Dabei zeigte sich auch in unserem Mauskollektiv die embryonale Letalität bub1b homozygoter Tiere, wie in den Tabellen 7 und 8 dargestellt. Anschließend wurden MEFs der Genotypen bub1b wt / p53 wt, bub1b het / p53 wt, bub1b wt / p53 hom und bub1b het / p53 hom nach Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer mit jeweils 10^5 Zellen pro Petrischale (80 x 15mm) unter standardisierten Bedingungen in Zellkultur gebracht. Ziel dieser Untersuchung war es, Unterschiede im Wachstumsverhalten der MEFs der verschiedenen Genotypen in vitro zu erkennen.

	bub1b wt / p53 hom	bub1b het / p53 hom	bub1b hom / p53 hom
n=35	n=9	n=24	n=2 (deformiert)
Verteilung	23%	71%	6%
Erwartete Verteilung	25%	50%	25%
Erwartete Verteilung bei embryonaler Letalität	33,3%	66,6%	0%

Tabelle 7 Tabellarische Darstellung der Anzahl der unterschiedlichen Genotypen der Embryonen eines Zuchtpaares mit den Genotypen bub1b het / p53 hom und bub1b wt / p53 hom: Es sind die realen Zahlen sowie die prozentualen Zahlen dargestellt. Des Weiteren die erwarteten Wahrscheinlichkeiten der einzelnen Genotypen mit und ohne embryonale Letalität bub1b homozygoter Tiere.

	bub1b wt / p53 wt	bub1b het / p53 wt	bub1b hom / p53 wt
n=43	n=13	n=29	n=1 (deformiert)
Verteilung	31%	67%	2%
Erwartete Verteilung	25%	50%	25%
Erwartete Verteilung bei embryonaler Letalität	33,3%	66,6%	0%

Tabelle 8 Tabellarische Darstellung der Anzahl der unterschiedlichen Genotypen der Embryonen eines Zuchtpaares mit den Genotypen *bub1b* het / *p53* wt und *bub1b* wt / *p53* wt: Es sind die realen Zahlen sowie die prozentualen Zahlen dargestellt. Des Weiteren die erwarteten Wahrscheinlichkeiten der einzelnen Genotypen mit und ohne embryonale Letalität *bub1b* homozygoter Tiere.

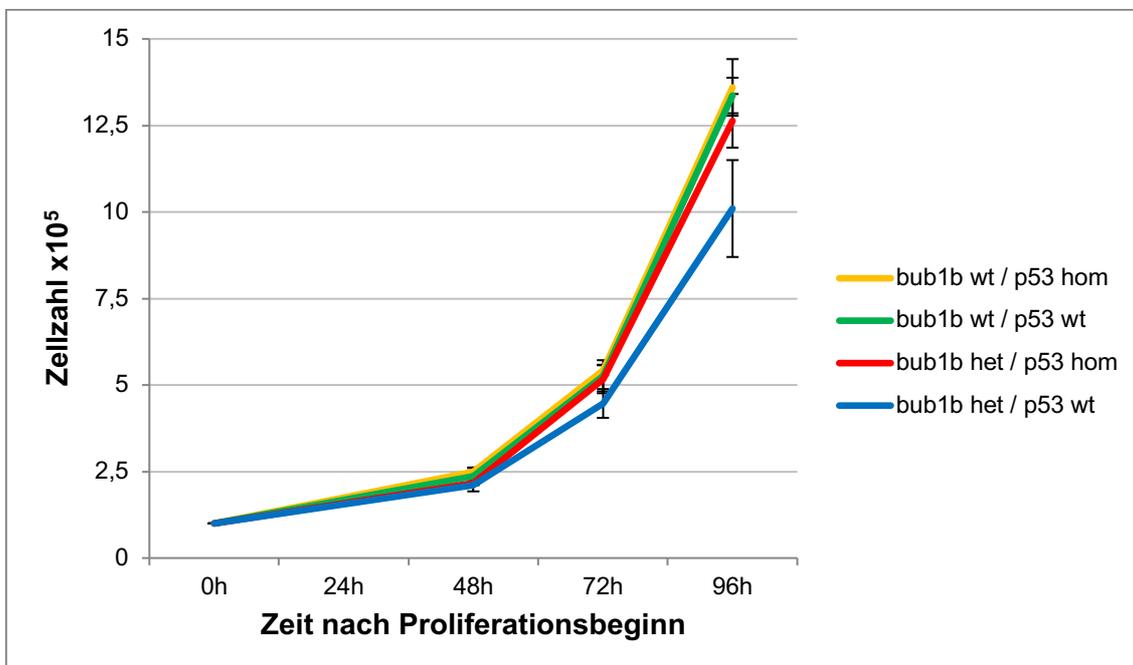


Abbildung 7 Genotyp-abhängige Zellproliferation MEFs im zeitlichen Verlauf: Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Messungen erfolgten 48h, 72h und 96h nach Beginn der Proliferation mit 10^5 Zellen pro Versuchsreihe.

Betrachtet man die im Diagramm 7 wiedergegebenen absoluten Zellzahlen der unterschiedlichen Genotypen im zeitlichen Verlauf über 96 Stunden, so zeigt sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied im Proliferationsverhalten der MEFs unter den genannten Genotypen, da alle errechneten p-Werte $\geq 0,068$ sind. Betrachtet man die MEFs des Genotyps *bub1b* het / *p53* wt so fällt nach 96 Stunden eine moderat reduzierte Zellzahl im Vergleich zu den MEFs der anderen Genotypen auf (p-Wert 0,068). Zusammenfassend zeigt aber dieser Versuch, dass die MEFs der verschiedenen

Genotypen in vitro vergleichbare Proliferationsraten in den ersten 96 Stunden nach Kultivierung aufweisen.

4.3 Zellzahlanalysen muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs) in Primärkultur abhängig vom bub1b- und p53-Genotyp nach Behandlung mit Docetaxel

Ein weiteres Ziel der Arbeit war zu untersuchen, ob MEFs, die heterozygot für bub1b und/ oder p53 defizient sind, den MSC korrekt aktivieren können. Um dies zu erreichen, wurden MEFs mit Docetaxel behandelt, dessen Wirkung in proliferierenden Zellen eine Aktivierung des MSCs beinhaltet. Im dargestellten Experiment wurden MEFs der unterschiedlichen Genotypen mit jeweils 10^5 Zellen pro Petrischale ausgesät. Es wurden jeweils unbehandelte und mit Docetaxel behandelte Kulturen angelegt und im zeitlichen Verlauf beobachtet, indem die Zellen nach 12, 24 und 48 Stunden von den Platten abgelöst und gezählt wurden. Die verwendete Docetaxelkonzentration (0,01 mg/ml) wurde zuvor mittels Titration wie unter 3.3.6.2 beschrieben, festgelegt.

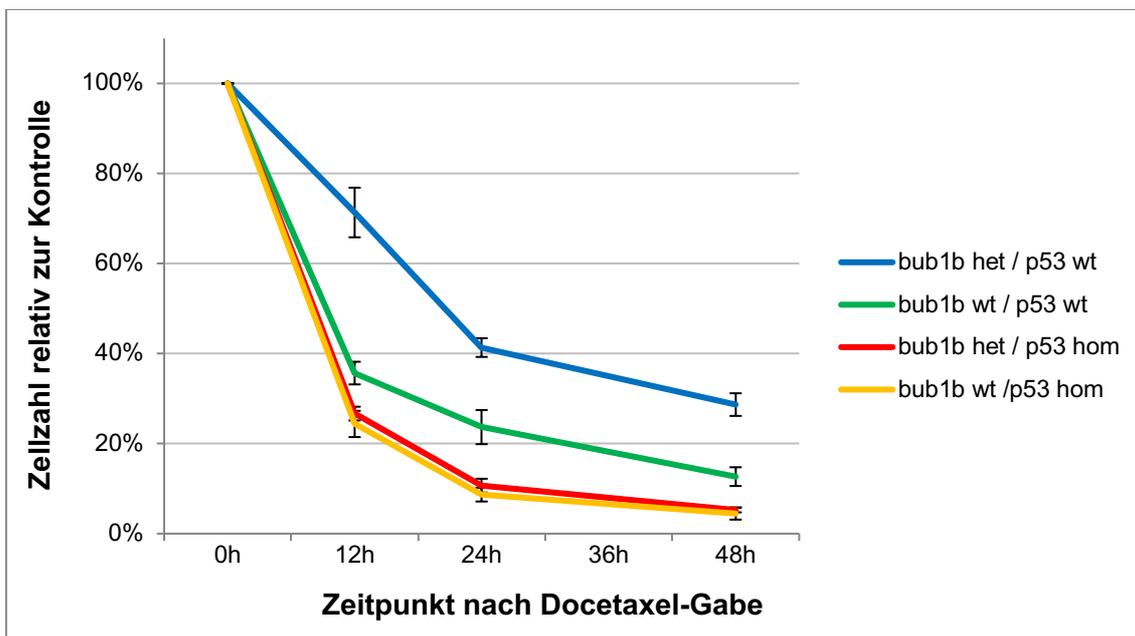


Abbildung 8 Genotyp-abhängige Inhibition der Zellproliferation MEFs in Abhängigkeit von der Dauer der Docetaxel-Inkubation (0,01 mg/ml): Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Messungen erfolgten 12h, 24h und 48h nach Zusatz von Docetaxel. Bei der Auswertung wurden relative Zellzahlen verglichen, also die prozentuale Zellzahl der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe von Zellen gleichen Genotyps und gleicher Proliferationsdauer sowie Passage.

Eine Auswertung der Daten von drei unabhängigen Versuchsreihen wird in Abbildung 8 wiedergegeben.

Bei den wildtypischen Zellen zeigt sich der erwartete Effekt des Docetaxel: der Anteil Docetaxel behandelter Zellen nimmt stetig ab im Vergleich zu den proliferierenden unbehandelten Kontrollzellen. 24 Stunden nach Docetaxel-Behandlung liegt der Anteil lebender Zellen bei ca. 23%.

Im Vergleich hierzu ist der Anteil Docetaxel behandelter für bub1b heterozygoter MEFs ca. 41%, also signifikant erhöht im Vergleich zu gleichbehandelten wildtypischen Zellen (23%). Betrachtet man die p53 defizienten MEFs, so ist der Anteil nach 24 Stunden Docetaxel-Behandlung ca. 11%. Dies bedeutet im Vergleich zu den wildtypischen Zellen, dass eine Reduktion des Anteils lebender Zellen stattgefunden hat.

In Abhängigkeit zu diesen Ergebnissen sollte der Effekt in Zellen des Genotyps bub1b het / p53 hom untersucht werden. In den MEFs dieses Genotyps fällt der Anteil lebender Zellen im Vergleich zu unbehandelten proliferierenden MEFs auf ca. 9%. Dieses Ergebnis zeigt, dass Zellen, die sowohl eine bub1b Heterozygotie aufweisen und gleichzeitig p53 defizient sind, sich nach Behandlung mit Docetaxel vergleichbar zu p53 defizienten Zellen verhalten. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass für bub1b heterozygote MEFs resistenter gegenüber der zytostatischen Wirkung von Docetaxel erscheinen, während MEFs, die p53 defizient sind, mit einer Abnahme an Zellen reagieren. Betrachtet man die MEFs des Genotyps bub1b het / p53 hom, so werden die bub1b heterozygote MEFs durch die p53 Defizienz sensitiver gegenüber dem zytostatischen Effekt von Docetaxel. Versteht man den in wildtypischen MEFs beschriebenen zytostatischen Effekt des Docetaxels als einen Arrest der proliferierenden Zellen im MSC, so kann man vermuten, dass für bub1b heterozygote MEFs eine unvollständige Arretierung im MSC erfahren und so vermehrt dem zytostatischen Effekt entgehen können. Um zu verstehen wieso es in bub1b het / p53 hom MEFs im Vergleich zu den für bub1b heterozygoten MEFs zu einer Abnahme an Zellen kommt, wurden in Anschluss Zellzyklusuntersuchungen vorgenommen.

4.4 Zellzyklusanalysen muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs) in Primärkultur abhängig vom bub1b- und p53-Genotyp

Um zu verifizieren, dass die beobachteten durch Docetaxel ausgelösten Effekte im Zusammenhang mit dem MSC stehen, wurde mit Hilfe einer Durchflusszytometrie der Anteil von MEFs in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus (G₁-Phase, G₂/M-Phase,

Polyploidie und S-Phase) bestimmt. In Abbildung 10 A wird beispielhaft an unbehandelten wildtypischen MEFs die Analyse der Verteilung erkennbar. Abbildung 9 zeigt, dass die wildtypischen MEFs unter den gegebenen Kulturbedingungen proliferieren und sich im Durchschnitt mehrerer unabhängiger Versuche 52 % der MEFs in der G₁-Phase, 29 % in der G₂/M-Phase, 7 % in der Polyploidie und 12 % in S-Phase befinden. In den Abbildungen 11 bis 13 werden beispielhaft die Zellzyklusanalysen von MEFs der unterschiedlichen Genotypen dargestellt. Abbildung 9 fasst auch die Mittelwerte der Zellzyklusanalysen der MEFs unterschiedlicher Genotypen im Vergleich zu den Ergebnissen wildtypischer MEFs zusammen. Man erkennt, dass sich die Zellzyklusverteilung in G₁-Phase, G₂/M-Phase, Polyploidie und S-Phase der proliferierenden MEFs verschiedener Genotypen nur unwesentlich untereinander und auch von den wildtypischen Zellen unterscheidet.

Ebenso ist der Koeffizient von G₁-Phase zu G₂/M-Phase, der als Indikator einer MSC-Aktivierung benutzt werden kann, zwischen den MEFs vergleichbar.

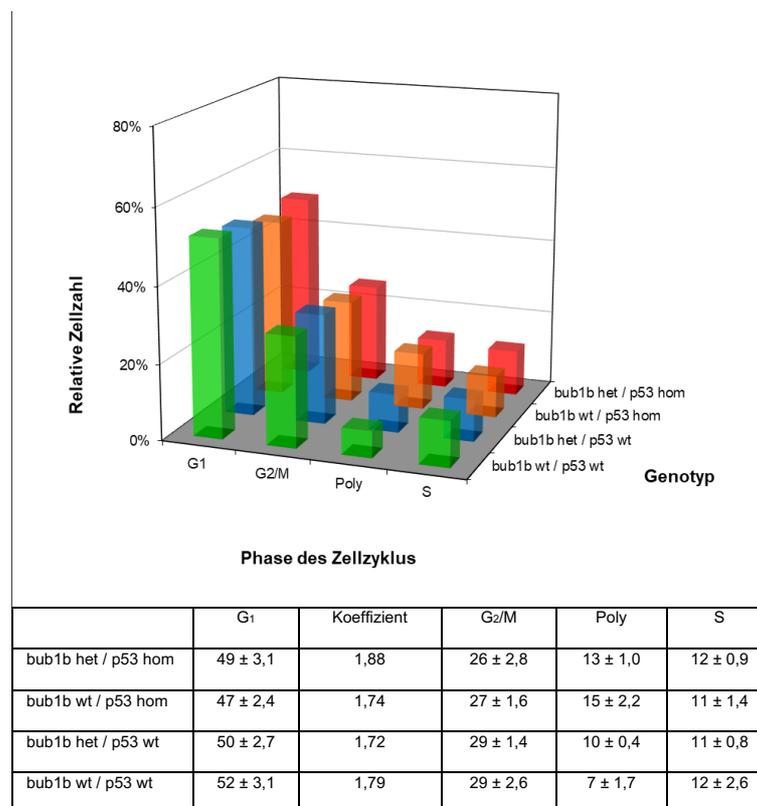


Abbildung 9 Relative Zellzahlen in den Phasen des Zellzyklus unterschiedlicher Genotypen ohne Docetaxel-Inkubation: Mit Angaben der zugrundeliegenden Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Analysen und entsprechenden Standardabweichungen in der Tabelle in %.

Geringfügige Unterschiede zeigen sich ausschließlich im Anteil von polyploiden Zellen der proliferierenden MEFs nach 48 Stunden. Die für p53 homozygoten Zellen weisen höhere Anteile polyploider Zellen auf. Dies bedeutet, dass p53 defiziente MEF Kulturen über die Zeit polyploide Zellen anreichern und kann als Hinweis auf einen Defekt der Apoptose solcher Zellen im p53 defizienten Hintergrund gewertet werden.

Aus diesen Ergebnissen kann zusammenfassend geschlossen werden, dass über den beobachteten Zeitraum die in vitro proliferierenden MEFs der verschiedenen Genotypen einen ungestörten Zellzyklus aufweisen.

4.5 Zellzyklusanalysen muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs) in Primärkultur abhängig vom bub1b- und p53-Genotyp nach Behandlung mit Docetaxel

Nachdem in den vorab beschriebenen Ergebnissen Unterschiede gegenüber dem zytostatischen Effekt von Docetaxel in MEFs der verschiedenen Genotypen beobachtet werden konnte, sollen nun die Zellzyklusanalysen dieser MEFs nach Docetaxel-Behandlung analysiert werden. Die Abbildungen 10 bis 13 (B und C) zeigen beispielhaft die FACS-Analysen 24 und 72 Stunden nach Docetaxelgabe.

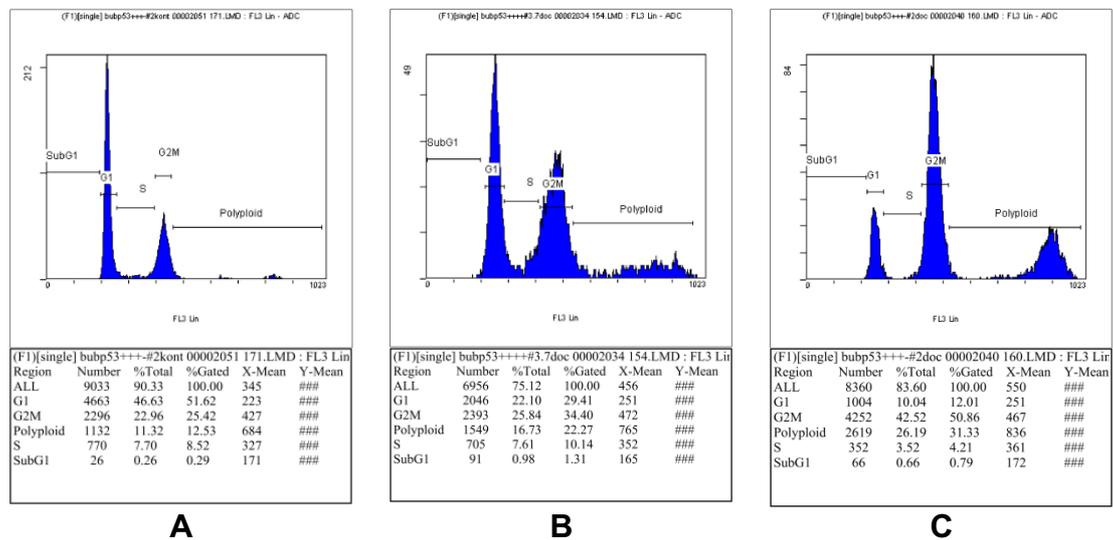


Abbildung 10 Beispiel der Phasenverschiebung des Zellzyklus bei unterschiedlichen Docetaxel-Inkubationszeiten: Genotyp bub1b wt / p53 wt vor Docetaxel-Inkubation (A), nach 24 Stunden Docetaxel-Inkubation (B), nach 72 Stunden Docetaxel-Inkubation (C).

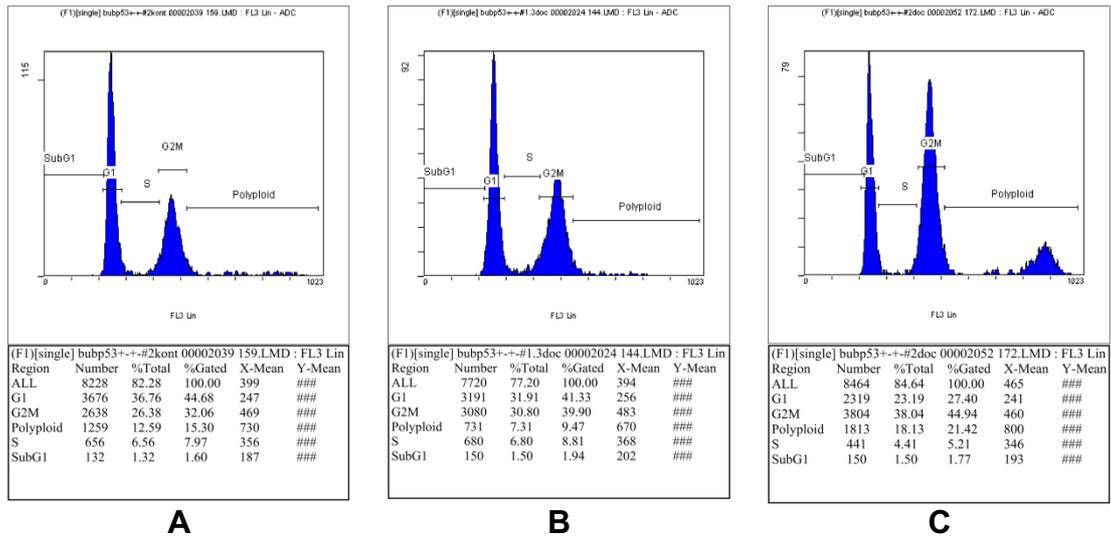


Abbildung 11 Beispiel der Phasenverschiebung des Zellzyklus bei unterschiedlichen Docetaxel-Inkubationszeiten: Genotyp bub1b het / p53 wt vor Docetaxel-Inkubation (A), nach 24 Stunden Docetaxel-Inkubation (B), nach 72 Stunden Docetaxel-Inkubation (C).

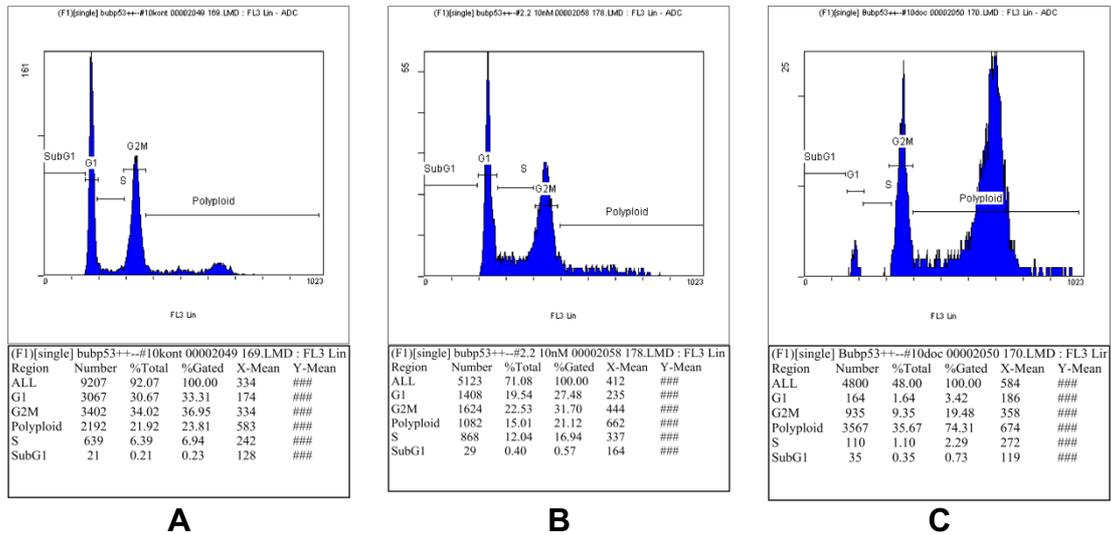


Abbildung 12 Beispiel der Phasenverschiebung des Zellzyklus bei unterschiedlichen Docetaxel-Inkubationszeiten: Genotyp bub1b wt / p53 hom vor Docetaxel-Inkubation (A), nach 24 Stunden Docetaxel-Inkubation (B), nach 72 Stunden Docetaxel-Inkubation (C).

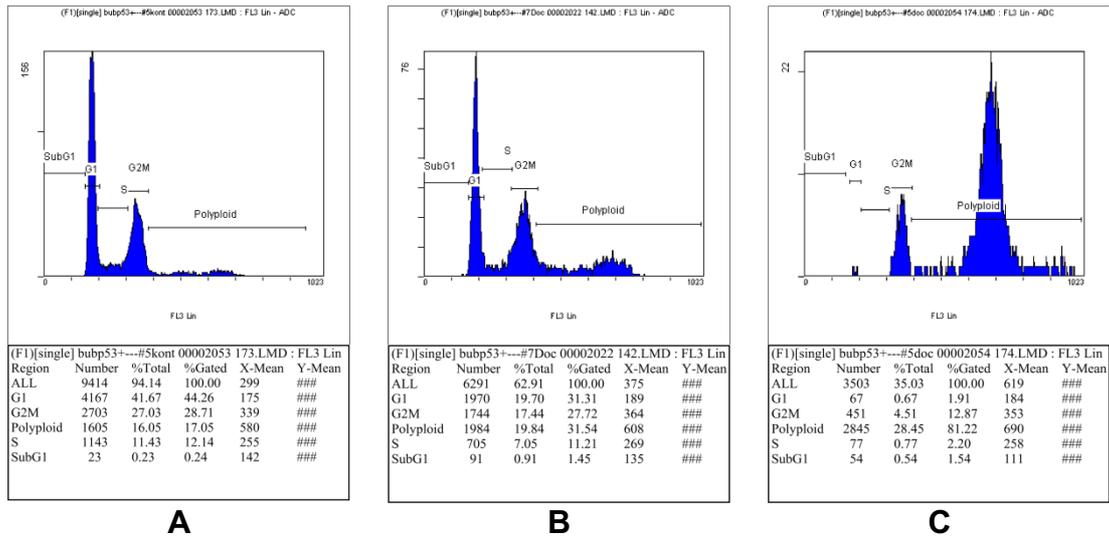


Abbildung 13 Beispiel der Phasenverschiebung des Zellzyklus bei unterschiedlichen Docetaxel-Inkubationszeiten: Genotyp bub1b het / p53 hom vor Docetaxel-Inkubation (A), nach 24 Stunden Docetaxel-Inkubation (B), nach 72 Stunden Docetaxel-Inkubation (C).

Erneut wurden die Zellzyklusanalysen aus drei unabhängigen Versuchen zusammengefasst und ausgewertet.

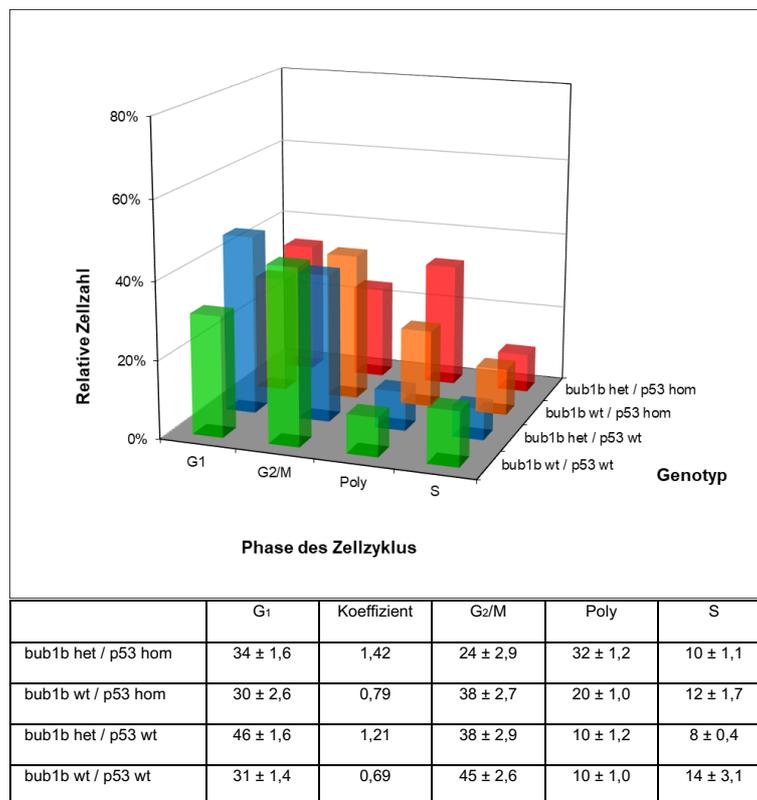


Abbildung 14 Relative Zellzahlen in den Phasen des Zellzyklus unterschiedlicher Genotypen nach 24 Stunden Docetaxel-Inkubationszeit: Mit Angaben der zugrundeliegenden Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Analysen und entsprechenden Standardabweichungen in der Tabelle in %.

Wie Abbildung 14 zeigt, verhalten sich die wildtypischen Zellen wie erwartet. Nach Aktivierung des MSC durch Docetaxel treten die proliferierenden Zellen in einen G₂/M-Arrest, der sich im Vergleich zu den unbehandelten Zellen in einem Anstieg des Anteils an Zellen in der G₂-/M-Phase (45%) manifestiert. Die Arretierung der MEFs im MSC ist durch einen geringeren Koeffizienten der G₁-Phase gegenüber der G₂/M-Phase (1,79 gegenüber 0,69) erkennbar. Es kommt in Docetaxel behandelten wildtypischen MEFs darüber hinaus zu einem geringen Anstieg der Zellen in der S-Phase und auch von polyploiden Zellen (von 7% auf 10%).

Im Gegensatz zu der wildtypischen Kontrollgruppe befindet sich mit 46 % der Zellen der größte Teil der Docetaxel behandelten bub1b heterozygoten MEFs in der G₁-Phase. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nimmt das Verhältnis von G₁-Phase zu G₂-/M-Phase zwar von 1,72 auf 1,21 ab, zur wildtypischen Docetaxel behandelten Kontrollgruppe ist es aber deutlich höher (1,21 gegenüber 0,69). Somit erscheint in für bub1b heterozygoten MEFs eine unvollständige Aktivierung des MSC stattzufinden, da ein größerer Teil der Zellen trotz Doxetaxel vermittelter Aktivierung des MSC die G₂-M-Phase durchläuft. Polyploide Zellen sind relativ gering vorhanden.

Betrachtet man nun die für bub1b wildtypischen und p53 homozygoten Zellen, so kommt es sich nach MSC-Aktivierung, ähnlich wie in wildtypischen MEFs, zu einem Anstieg von Zellen in der G₂-/M-Phase (38%). Dennoch befinden sich deutlich weniger MEFs in der G₂-/M-Phase, was sich auch im Verhältnis von G₁-Phase zu G₂-/M-Phase (0,79 gegenüber 0,69) verdeutlicht. Das könnte ein Hinweis dafür sein, dass auch ein Fehlen von p53 eine unvollständige Aktivierung des MSC zur Folge hat. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist in p53 defizienten MEFs der Anteil der polyploiden Zellen (20%) deutlich höher.

Bei den Zellen des kombinierten Genotyps bub1b het / p53 hom ist das Verhältnis von G₁-Phase zu G₂-/M-Phase im Vergleich zu den wildtypischen Zellen aber auch zu den beiden anderen Genotypen am größten (1,42). Dennoch befindet sich nur ein relativ kleiner Anteil der Docetaxel behandelten MEFs in der G₂-Phase (24%).

Die Aktivierung des MSC erscheint somit am stärksten gehemmt. Zusätzlich kann aber beobachtet werden, dass im Vergleich zu den anderen Genotypen ein großer Anteil der MEFs polyploid ist (32%).

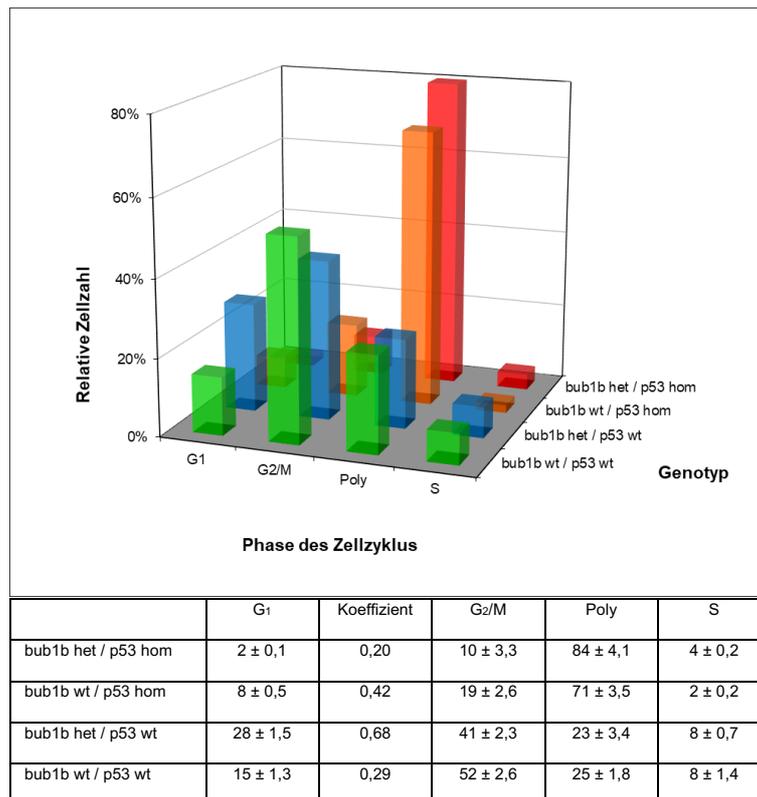


Abbildung 15 Relative Zellzahlen in den Phasen des Zellzyklus unterschiedlicher Genotypen nach 72 Stunden Docetaxel-Inkubationszeit: Mit Angaben der zugrundeliegenden Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Analysen und entsprechenden Standardabweichungen in der Tabelle in %.

Ergänzend wurde die Zellzyklus-Verteilung der Zellen nach 72 Stunden Docetaxel-Behandlung analysiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde im Vergleich zu den 24 Stundenwerten eine nochmals verringerte Zellzahl der Docetaxel behandelten MEFs aller Genotypen im Vergleich zu den unbehandelten MEFs der Kontrollgruppen beobachtet. Die Analysen des DNA-Gehalts zeigen, daß die wildtypischen MEFs weiterhin in der G₂-/M-Phase akkumulieren, während bub1b heterozygote MEFs, wie bereits nach 24 Stunden beobachtet, einen unvollständige Aktivierung des MSC aufweisen (Koeffizient G₁-Phase gegenüber G₂-/M-Phase 0,29 zu 0,68). In p53 defizienten MEFs fällt besonders ein starker Anstieg von polyploiden Zellen auf, während der Anteil der Zellen in der G₁-Phase und G₂-/M-Phase verringert ist. Dieser Effekt kommt in MEFs des Genotyps bub1b het / p53 hom nochmals verstärkt zum Tragen, sodass nur noch ein geringer Anteil von MEFs in der G₁-Phase (2%) oder G₂-/M-Phase (10%) vorhanden ist und der Anteil der polyploiden Zellen auf 84 % steigt.

Abschließend wurden - getrennt nach den verschiedenen Zellzyklusphasen - die Anteile der Zellen der verschiedenen Genotypen über den Beobachtungszeitraum aufgetragen und in den folgenden Abbildungen 16 bis 19 dargestellt.

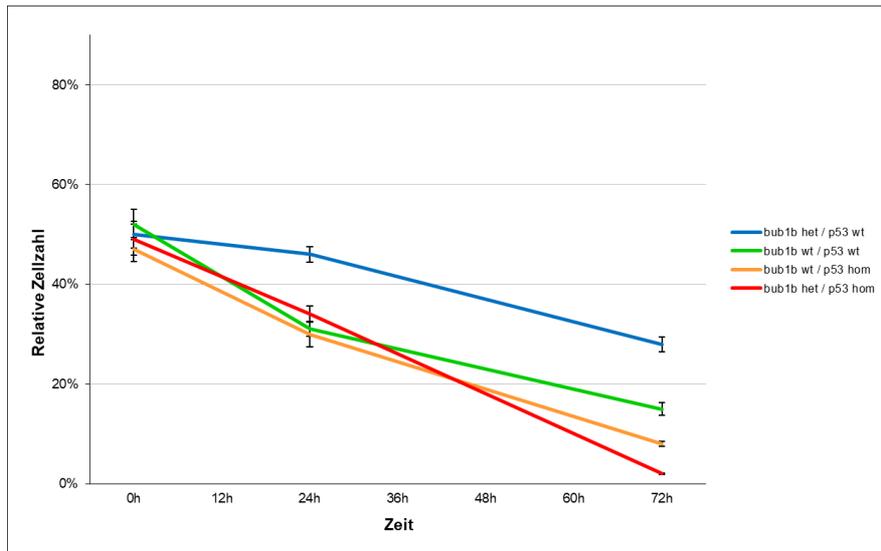


Abbildung 16 Relative Zellzahlen unterschiedlicher Genotypen in der G₁-Phase des Zellzyklus zu unterschiedlichen Docetaxel-Inkubationszeiten: Mit Angaben der zugrundeliegenden Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Analysen und entsprechenden Standardabweichungen.

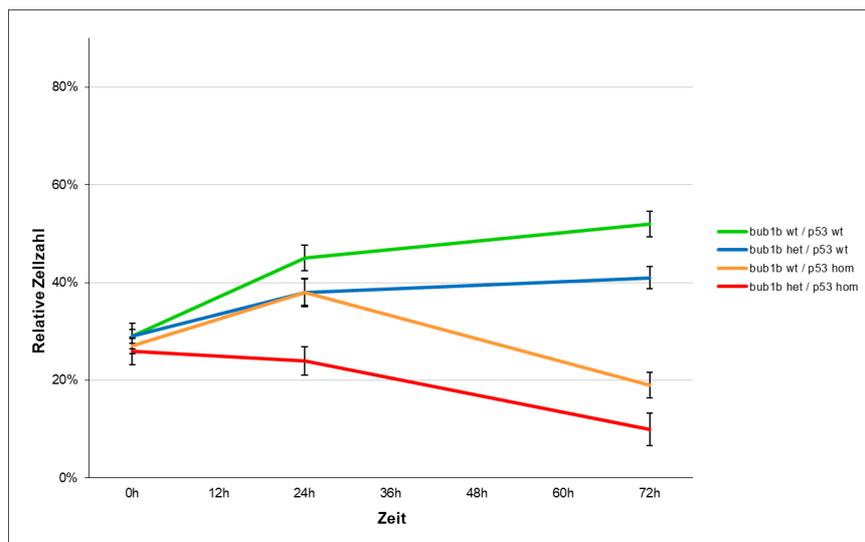


Abbildung 17 Relative Zellzahlen unterschiedlicher Genotypen in der G₂-/Meta-Phase des Zellzyklus zu unterschiedlichen Docetaxel-Inkubationszeiten: Mit Angaben der zugrundeliegenden Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Analysen und entsprechenden Standardabweichungen.

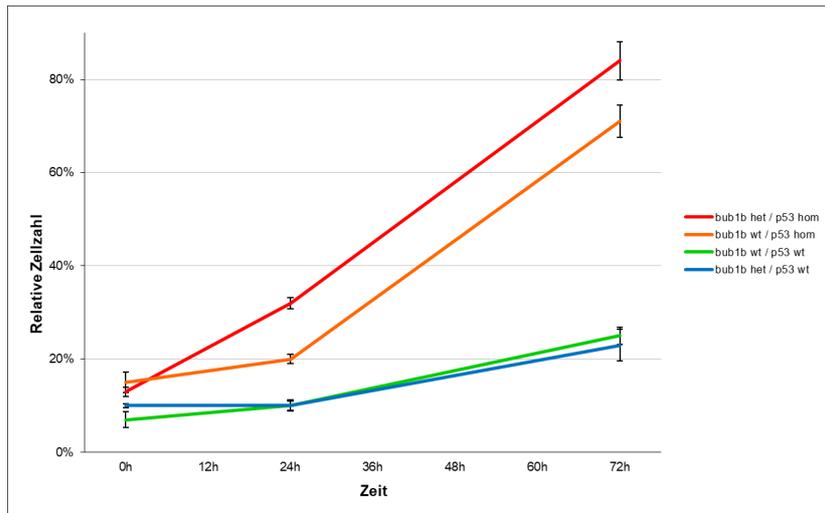


Abbildung 18 Relative Zellzahlen unterschiedlicher Genotypen in der Polyploidie zu unterschiedlichen Docetaxel-Inkubationszeiten: Mit Angaben der zugrundeliegenden Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Analysen und entsprechenden Standardabweichungen.

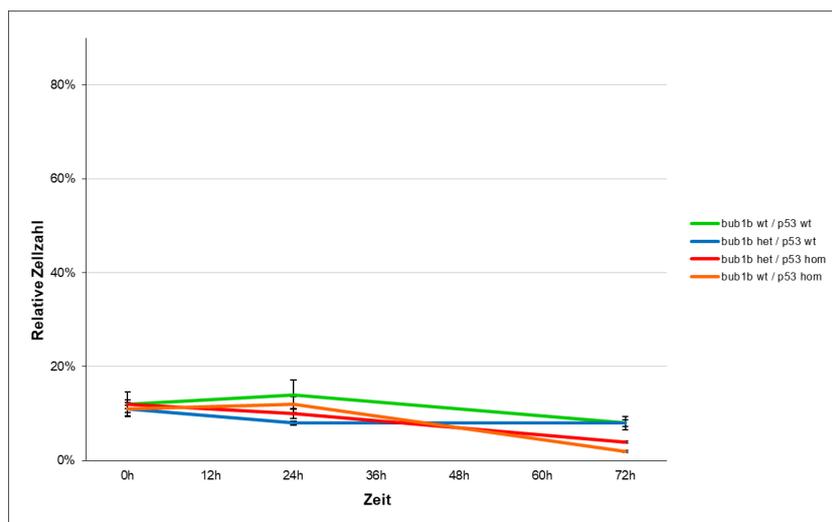


Abbildung 19 Relative Zellzahlen unterschiedlicher Genotypen in der S-Phase des Zellzyklus zu unterschiedlichen Docetaxel-Inkubationszeiten: Mit Angaben der zugrundeliegenden Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Analysen und entsprechenden Standardabweichungen.

Betrachtet man die Kontrollgruppe im zeitlichen Verlauf in der G₁-Phase (Abbildung 16), so kommt es 24 Stunden nach Aktivierung zu einem deutlichen Abfall der relativen Zellzahl auf 31%, der sich nach 72 Stunden auf 15% abschwächt. Dementsprechend erhöhen sich in der G₂-/M-Phase (Abbildung 17) die relativen Zellzahlen auf 52% nach 72 Stunden. Der Anteil der polyploiden Zellen (Abbildung 18) bleibt zunächst relativ konstant bei 10 % nach 24 Stunden und steigt erst danach auf 25% an. Der Anteil der Zellen in der S-Phase (Abbildung 19) bleibt zwischen 14 und 8%. Diese Kurvenverläufe

spiegeln eine Aktivierung des MCS wieder und deuten eine im Verlauf moderat eingeschränkte Apoptosefähigkeit an.

Die Zellen des Genotyps *bub1b* het / *p53* wt zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe, sowohl nach 24 Stunden (46%), als auch nach 72 Stunden (28%) deutlich höhere relative Zellzahlen in der G₁-Phase (Abbildung 17). Dem gegenüber steht ein nicht so deutlicher Anstieg der relativen Zellzahlen in der G₂/M-Phase (Abbildung 18) auf 41% nach 72 Stunden. Bzgl. der polyploiden Zellen und des Anteils von Zellen in der S-Phase zeigen sich mit der Kontrollgruppe vergleichbare Werte. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt sich eine deutliche Kompromittierung der Aktivierung des MSC bei nahezu gleichen polyploiden Zellzahlen.

Beim Genotyp *bub1b* wt / *p53* hom weisen die Zellen in der G₁-Phase (Abbildung 17) nach 24 Stunden einen zunächst zur Kontrollgruppe vergleichbaren Rückgang der relativen Zellzahlen auf 30%, der sich nach 72 Stunden aber auf 8% verstärkt. In der G₂/M-Phase (Abbildung 19) kommt es nach 24 Stunden zunächst zu einem entsprechenden Anstieg auf 38%, nach 72 Stunden jedoch zu einer starken Abnahme der relativen Zellzahl auf 19%. Dies spiegelt sich in dem rasanten Anstieg der polyploiden Zellen (Abbildung 18) auf 71% nach 72 Stunden wider. In der S-Phase (Abbildung 19) zeigt sich nach 72 Stunden ein deutlicher Rückgang der Zellzahlen auf 2%. In den Kurvenverläufen sieht man zunächst Hinweise auf eine moderate Kompromittierung des MSC im Vergleich zu den Zellen des Genotyps *bub1b* het / *p53* wt. Im Verlauf wird dies jedoch durch die Drift der Zellen in die Polyploide aufgrund der mangelnden Apoptosefähigkeit überdeckt.

Bei den Zellen mit Heterozygotie für *bub1b* und Homozygotie für *p53* kommt es nach 72 Stunden in der G₁-Phase (Abbildung 17) zur deutlichsten Abnahme der relativen Zellzahlen auf 2%. Auch in der G₂/M-Phase (Abbildung 18) nehmen die Zellzahlen schon nach 24 Stunden (24%) ab und betragen nach 72 Stunden 10%. Diese im Vergleich zu den Zellen des Genotyps *bub1b* wt / *p53* hom noch deutlichere Abnahme der Zellen spiegelt sich in dem noch deutlicheren Anstieg der Zahlen polyploider Zellen wider, 32% nach 24 Stunden und 84% nach 72 Stunden. In der S-Phase (Abbildung 19) verhalten sich die *p53* defizienten Genotypen nahezu gleich. Hier zeigen die Kurven eine noch größere Drift in die Polyploidie als Zeichen eines deutlich kompensierten MSC und einer verstärkten Unfähigkeit zur Apoptose im Vergleich zum Genotyp *bub1b* het / *p53* wt.

Zusammenfassend kann anhand der Untersuchungen hervorgehoben werden, dass der MSC in bub1b heterozygoten MEFs nur unvollständig aktiviert werden kann. Ebenso kann eine unvollständige MSC-Aktivierung in p53 defizienten MEFs beobachtet werden. Bub1b heterozygote und p53 defiziente MEFs zeichnen sich durch den kleinsten Koeffizienten der G₁-Phase gegenüber der G₂/M-Phase aus, sodass in diesen MEFs die Docetaxel induzierte Aktivierung des MSC am unvollständigsten stattfindet. Gleichzeitig kommt es nach Docetaxel-Behandlung in bub1b heterozygoten und p53 defizienten MEFs zu einem Anstieg von polyploiden Zellen, der in wildtypischen oder bub1b heterozygoten Zellen kaum zu beobachten ist. Dieser Anstieg kann auch in p53 defizienten MEFs festgestellt werden, wird aber nochmals signifikant verstärkt in bub1b heterozygoten und p53 defizienten MEFs.

5 DISKUSSION

Die Rolle des Gens *bub1b* im MSC und die Funktion des Gens *p53* sind in der Literatur ausführlich beschrieben⁶. Allerdings werden beide Gene meistens voneinander getrennt betrachtet. Da *bub1b*-Defizienz zu embryonaler Letalität führt, können *bub1b* defiziente Zellen nicht etabliert werden. Die verwendete *bub1b* defiziente Maus kann aber als Modell für eine reduzierte *bub1b* Expression (Haploinsuffizienz) oder als genetisches Modell (Heterozygotie) verstanden werden. Allerdings kommt es in den *bub1b* heterozygoten Mäusen nur zu einem sehr schwachen Tumorphänotyp, da erst in sehr alten Mäusen eine geringe Inzidenz von spontaner Tumorgenese beobachtet wird.^{61,62}

Um die Bedeutung von *bub1b* als mögliches Tumorsuppressorgen genauer zu untersuchen, wurde daher *bub1b* in die *p53* defiziente Maus eingekreuzt, um die Rolle einer Heterozygotie für *bub1b* auf die Entstehung und Progression von *p53* defizienten Tumoren zu untersuchen. Mit Hilfe des Mausmodells und aus dem Mausmodell abgeleiteten embryonalen Zellen sollen mögliche Wechselwirkungen zwischen *bub1b* Heterozygotie und *p53* Defizienz dargestellt werden.

5.1 Die Rolle von *bub1b* und *p53* in der Embryogenese eines Mauskollektivs

Für *bub1b* homozygote Tiere sterben schon als Embryonen. Ging man anfangs von einem Überleben dieser Embryonen von ca. sechs Tagen aus, so weiß man heute, dass die Mehrzahl zwischen dem siebten und achten Tag verstirbt⁵⁹, einige Embryonen aber bis zum 16. Tag überleben. Für *bub1b* heterozygote Embryonen entwickeln sich dagegen normal.⁵⁹ Dieser Sachverhalt wurde durch unsere Ergebnisse bei der Genotypisierung der Mäuse bestätigt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten während der Gewinnung der MEFs am zwölften Tag der Schwangerschaft keine *bub1b* homozygoten Tiere bzw. nur sehr selten stark verkümmerte Embryonen beobachtet werden.

In der Literatur wird beschrieben, dass weibliche Embryonen mit Homozygotie für *p53* geringfügig erhöht Anenzephalien und andere Defekte des Neuralrohrs aufweisen^{63,64}. Auch Fehlbildungen der Retina oder der Linse treten öfter auf. Ansonsten entwickeln sich diese Embryonen aber normal⁶³. Auch dieser Sachverhalt wurde durch unsere Ergebnisse nach Genotypisierung und Gewinnung von MEFs im verwendeten Mauskollektiv bestätigt.

Einen Einfluss der Kombination von *bub1b* und *p53* auf die Embryogenese zeigte sich nicht, da sich die Verhältnisse der Genotypen der Tag 12 Embryonen, die zur Gewinnung von MEFs verwendet wurden, nicht signifikant ändern. Da nach heutigem Kenntnisstand die apoptotische Wirkung des MSCs durch *p53* entscheidend mitreguliert wird, kann man vermuten, dass in den *p53* defizienten Mäusen nach Kreuzen mit *bub1b* homozygoten Tieren ein verlängertes embryonales Überleben dieser Tiere eintritt. Die Ergebnisse zeigten aber keinen Einfluss der *p53*-Defizienz auf ein verlängertes Überleben von *bub1b* defizienten Embryonen. Somit spielt *p53* offensichtlich für die Letalität von *bub1b* defizienten Mäusen keine oder nur eine untergeordnete Rolle.

5.2 Einfluss der Heterozygotie für *bub1b* auf das Überleben eines Mauskollektivs

Die in unserer Arbeitsgruppe generierten und verwendeten für *bub1b* heterozygoten Tiere⁵⁹ verhielten sich wie bereits etablierte *bub1b* heterozygote Mausmodelle, die in der Literatur beschrieben werden^{42,43}. Im beobachteten Überlebenszeitraum unterschieden sie sich weder im Verhalten, der Fertilität oder der Anatomie signifikant gegenüber wildtypischen Tieren. Eine durch andere Autoren gezeigte Größen-retardierung bei ca. 4% der für *bub1b* heterozygoten Tiere wurde im Rahmen des Versuchs nicht kontrolliert⁵⁹. Ein erhöhtes Risiko für Lungentumore oder Lymphome für sehr alte Tiere des Genotyps *bub1b* het, welches in der Literatur ebenfalls beschrieben wird⁵⁹, konnte in den Tieren, die nach 100 Wochen untersucht wurden, statistisch nicht nachgewiesen werden. Allerdings wiesen in der Autopsie nach 100 Wochen drei Tiere ein Lymphom auf, während in der Kontrollgruppe keine Tumore gefunden wurden. Insgesamt konnte in *bub1b* heterozygoten Tieren keine erhöhte Inzidenz an Tumoren in adulten Mäusen nachgewiesen werden.

5.3 Einfluss der Homozygotie für *p53* auf das Überleben eines Mauskollektivs

Während für die Homozygotie für *p53* im Embryonalstadium bei Mäusen nur wenige Veränderungen beschrieben sind und junge Mäuse sich normal entwickeln, so sind Weibchen vermehrt infertil⁶⁵. Dies hat in unserem Versuchsaufbau jedoch keine Rolle gespielt. Weiterhin ist bekannt, dass *p53* homozygote Tiere früh Sarkome und disseminierte sowie thymoidale Lymphome entwickeln, die zu einem durchschnittlichen Überlebensalter von 22 Wochen führen⁶⁵. In unserem Kollektiv wiesen die Tiere einen

vergleichbaren Tumorphänotyp und ein vergleichbares Überlebensalter von durchschnittlich 20 Wochen auf. Die von uns untersuchten p53 defizienten Mauskollektive zeigten somit den für p53 defiziente Mäuse typischen Tumorphänotyp.

5.4 Tumorgenese in einem für bub1b heterozygoten und p53 homozygoten Mauskollektiv

Nach Kreuzung von für bub1b heterozygoten Tieren mit den für p53 homozygoten Tieren, konnte ein Kollektiv mit dem Genotyp bub1b het / p53 hom generiert und ausgewertet werden. Diese Mäuse zeigten einen ähnlichen Phänotyp, wie diejenigen mit dem Genotyp bub1b wt / p53 hom. Sie entwickelten Sarkome und Lymphome und hatten ein mit den p53 homozygoten Mäusen vergleichbares, aber etwas geringeres, durchschnittliches Überlebensalter von 19 Wochen. Die Vermutung, dass es bei diesen beiden Genotypen keine relevanten Unterschiede in der Tumorgenese gibt, ist allerdings bei genauerer Betrachtung der unterschiedlichen Tumorentitäten nicht zutreffend. Tiere beider Genotypen unterscheiden sich in der Verteilung der einzelnen Tumorentitäten signifikant. So zeigten Tiere des Genotyps bub1b het / p53 hom deutlich mehr disseminierte Lymphome als thymoidale Lymphome, allerdings zu einem späteren Zeitpunkt. Sarkome traten deutlich früher auf, nahmen allerdings in der Anzahl ab (Siehe Tabellen 5 und 6).

Da durch die Haploinsuffizienz des Tumorsuppressors BUB1B in p53 defizienten Mäusen insbesondere die Entwicklung von disseminierten Lymphomen bevorzugt erfolgt, kann vermutet werden, dass die Entstehung von disseminierten Lymphomen in Zusammenhang mit Defekten im MSC steht. Ob dies aber tatsächlich auf eine reine Haploinsuffizienz zurückzuführen ist oder der Effekt durch den Verlust des zweiten Allel bzw. einen „lose of heterozygoty“ in Zusammenhang mit der Homozygotie für p53 verursacht wird, muss weiter untersucht werden.

Die veränderte Verteilung der Tumorentitäten kann Einfluss auf das Gesamtüberleben oder das tumorspezifische Überleben von Mauskollektiven haben. Für eine gesicherte Aussage müsste allerdings ein größeres Kollektiv untersucht werden. Was einen erheblichen höheren finanziellen, logistischen und zeitlichen Mehraufwand bedeutet.

Auch welche Rolle diese Einflüsse ggf. in humanen Lymphomen und Sarkomen spielen, ist von Interesse.

So konnten Wan et al.⁶⁶ zeigen, dass ein aktives bub1b-Signal entscheidend für das Wachstum von Rhabdomyosarkomzellen ist und bub1b zumindest in diesem Kontext eine onkogene Rolle zukommt. In Osteosarkomen scheint bub1b dagegen eine schützende Funktion auszuüben⁶⁷.

In EBV transformierten Lymphoblasten, welche mit Burkitt- und Hodgkinlymphomen assoziiert sind, zeigt sich darüber hinaus eine mehr als 6fach höhere Expression von bub1b⁶⁸.

In unserem Mausmodell wurde für die Haploinsuffizienz von bub1b eine Abnahme von Sarkomen und eine Zunahme disseminierter Lymphome gezeigt, was den Ergebnissen in humanen Osteosarkomen und Hodgkinlymphomen auf den ersten Blick zu widersprechen scheint. Somit lässt sich bub1b nicht grundsätzlich als Tumorsuppressorgen oder Onkogen vereinnahmen, vielmehr scheint seine Rolle in hohem Maße entitäts-, situations- und ggf. auch artspezifisch zu sein.

5.5 Einfluss des Genotyps für bub1b und p53 auf die Proliferation von primären murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)

Aus der Literatur ist bekannt, dass bub1b homozygote MEFs, die aus ca. vier Tage alten Embryonen gewonnen werden, sich über zwei Tage genauso teilen wie bub1b heterozygote oder wildtypische Zellen. Danach stagniert die Proliferation, während sich die Zellen der beiden letzteren Gruppen weiter identisch teilen⁵⁹.

In Proliferationsversuchen konnten keine bub1b homozygoten Zellen untersucht werden, da unsere MEFs am zwölften Tag der Schwangerschaft gewonnen wurden. Zu diesem Zeitpunkt waren die homozygoten Embryonen in der Regel bereits abgestorben und resorbiert. Unterschiede im p53 Status der MEFs zeigten keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten, sie sind daher mit den wildtypischen Zellen der Kontrollgruppe in Bezug auf die Proliferation vergleichbar.

Wenn in unserem Versuch auch nicht statistisch signifikant, so zeigten nur die bub1b heterozygoten Zellen tendenziell ein etwas geringeres Proliferationsverhalten. In

Kombination mit einer Homozygotie für p53 waren sie mit der wildtypischen Kontrollgruppe vergleichbar.

5.6 Verhalten von primären murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) in Abhängigkeit des Genotyps für bub1b und p53 nach Docetaxel-Behandlung

Die Behandlung von Zellen mit Docetaxel führt zu einer unvollständigen Ausbildung des Spindelapparats und daraus resultierend zur fehlerhaften Verteilung der Chromosomen in den sich bildenden Tochterzellen. Dies führt normalerweise zu einer Aktivierung des MSC und damit zu einer Arretierung des Zellzyklus in der G₂-/M-Phase. Der Arrest führt zu einem Anstieg der mitotischen Zellen in dieser Phase und wird durch die Abnahme des Koeffizienten von G₁-Phase zu G₂-/M-Phase sichtbar. Als Resultat des Arrestes versucht die Zelle nun entweder durch Reparaturmechanismen den Defekt zu beheben oder bei irreparablen Fehlern die Apoptose auszulösen. Wenn beides nicht oder nur unvollständig möglich ist, können polyploide Zellen entstehen⁶.

Betrachtet man die Zellzahlen der MEFs nach Behandlung mit Docetaxel, so zeigen die wildtypischen Zellen der Kontrollgruppe durch die Aktivierung des MSC das erwartete Verhalten. Durch die Aktivierung des MSC kommt es zu einer Zellverarmung und zu einer Inhibierung der Proliferation. Die Proliferationsinhibierung (Abnahme der Zellzahlen) kann hier als direkte Folge der Docetaxel vermittelten Defekte des Spindelapparats mit resultierender Aktivierung des MSC gesehen werden. Korrespondierend hierzu zeigte sich auch in den Analysen des Zellzyklus in den wildtypischen Zellen ein erhöhter Anteil der Zellen sowohl nach 24 Stunden, als auch nach 72 Stunden in der G₂-/M-Phase.

Bei den bub1b heterozygoten Zellen zeigte sich eine erhöhte Resistenz gegenüber der Docetaxel-Behandlung. Sie hatten in Folge der Docetaxel-Behandlung im zeitlichen Verlauf signifikant höhere relative Zellzahlen. Zudem wurde in den Zellzyklusanalysen durch das größere Verhältnis von G₁-Phase zu G₂-/M-Phase im Vergleich zur Kontrollgruppe eine unvollständige Arretierung des MSC beobachtet. Bei den polyploiden Zellen zeigten sich keine Unterschiede zur Kontrollgruppe. Dies kann bedeuten, dass Tumore mit Anteilen bzw. Populationen bub1b heterozygoter Zellen resistent gegenüber einer Therapie mit Spindelgiften sind.

Die Zellen mit einer Homozygotie für p53 wiesen nach Docetaxel-Behandlung signifikant niedrigere Zellzahlen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf und sind somit sensitiver gegenüber Docetaxel. In der Zellzyklusanalyse zeigte ein geringerer Anteil an Zellen eine Aktivierung des MSC, da das Verhältnis von G₁-Phase zu G₂-/M-Phase im zeitlichen Verlauf immer größer als das der Kontrollgruppe war. Vermutlich durch den Verlust der p53 vermittelten Induktion der Apoptosefähigkeit kam es zu einem rasanten Anstieg der polyploiden Zellen. So könnten Tumore mit Zellen dieses Genotyps zwar initial gut auf eine Therapie mit Spindelgiften ansprechen, gleichzeitig aber schneller entarten bzw. heterogenere Zellklone entwickeln.

Der kombinierte Genotyp bub1b het / p53 hom zeigte sowohl bei der Proliferation, als auch bei den relativen Zellzahlen nach Aktivierung des MSC ein vergleichbares Verhalten wie die Zellen des Genotyps bub1b wt / p53 hom. Sie wiesen also nicht die durch die Heterozygotie von bub1b beobachtete gesteigerte Resistenz gegenüber Taxanen auf, sondern eine erhöhte Sensibilität, wie durch die Homozygotie von p53 beobachtet. Betrachtet man die Zellzyklusanalysen, so sieht man nach 24 Stunden Docetaxel-Behandlung ein deutlich erhöhtes Verhältnis von G₁-Phase zu G₂-/M-Phase als Zeichen einer verminderten Aktivierung des MSC. Dies führt bei gleichzeitigem Verlust der p53 vermittelten Apoptosefähigkeit zu noch mehr polyploiden Zellen als bei den Zellen des Genotyps bub1b wt / p53 hom. Ursächlich hierfür ist das Fehlen von Reparaturmechanismen, welche durch den aktivierten MSC vermittelt werden sowie die Unfähigkeit zur Apoptose trotz chromosomaler Aberrationen. Nach 72 Stunden kommt es allerdings zu einer verstärkten Aktivierung des MSC. Was sich im kleinsten Verhältnis von G₁-Phase zu G₂-/M-Phase aller Genotypen zeigt. Dieser Effekt kann aber auch darauf zurückzuführen sein, dass sich zu wenige nicht polyploide Zellen innerhalb der Stichproben befanden.

5.7 Die Kombination von Heterozygotie für bub1b und Homozygotie für p53

In Bezug auf die relativen Zellzahlen tritt in unserem kombinierten Zellmodell mit dem Genotyp bub1b het / p53 hom die bub1b vermittelte Resistenz gegen Doxetacel völlig in den Hintergrund, während die durch die Homozygotie für p53 bedingten Sensibilisierung für Docetaxel bestehen bleibt. In den Zellzyklusanalysen zeigt sich zunächst eine Potenzierung der Aktivierung des MSC, die im zeitlichen Verlauf jedoch nicht mehr

nachweisbar ist, aber zu einer verstärkten Bildung von polyploiden Zellen führt. Die Heterozygotie für *bub1b* verursacht in *p53* defizienten Zellen somit eine verstärkte Inhibierung der Proliferation.

Dies zeigt, dass *bub1b* unter diesen Bedingungen keine klassische tumorsuppressive Funktion aufweist. Vielmehr scheint hier die Haploinsuffizienz, im Gegensatz zur Haploinsuffizienz ohne Defekt im Gen *p53*, zu antiproliferativen Effekten zu führen. Da es dennoch zu einer Anhäufung von polyploiden Zellen kommt, kann man hier allenfalls von einer partiellen tumorsuppressiven Funktion ausgehen.

Neben diesen schützenden Eigenschaften zeigen sich allerdings in anderem Kontext auch onkogene (Teil-)Funktionen. Die Aktivierung des MSC mit Docetaxel in Zellen dieses Genotyps hat eine gehäufte Persistenz von Vorstufen maligner Zellen zur Folge. Da Polyploidie als eine Form der Aneuploidie in der Tumorgenese eine entscheidende Rolle spielt, kann eine Erhöhung polyploider Zellen mit einem erhöhten Tumorrisiko einhergehen⁶⁹.

Somit scheint die Funktion von *bub1b* stark von dem Mikromilieu und Funktionszustand der Zellen abhängig zu sein. In sich teilenden *p53* defizienten Zellen scheint der Verlust eines *bub1b*-Allels schützend im Sinne einer Proliferationsinhibierung zu wirken.

Daneben ist dieser Genotyp gegenüber einer Docetaxel-Behandlung verstärkt sensitiv, da die relativen Zellzahlen unter denen der wildtypischen Kontrollen liegen.

Ob diese hier in MEFs nachgewiesenen Effekte auch in der Tumorthherapie bzw. *in vivo* von Relevanz sind, müsste zunächst in Tumorzelllinien überprüft werden. Dass diese Effekte die Tumorentitäten in unserem Mausmodell beeinflussten, konnte nachgewiesen werden.

5.8 Klinische Relevanz von *bub1b* und *p53* sowie deren Kombination in der Tumorentstehung und -therapie

In klinischen Kontext gesehen, muss aufgrund der gewonnenen Ergebnisse folgende Frage gestellt werden: Spielt in Tumorentitäten, die momentan unter bestimmten Umständen mit einer Chemotherapie durch Spindelgifte therapiert werden, wie z.B. das Prostatakarzinom, das Mammakarzinom und das Ovarialkarzinom, die Heterozygotie für

bub1b überhaupt eine Rolle? Zumindest beeinflusst bub1b das Prostatakarzinom. Aus einer neueren Studie geht hervor, dass eine Überexpression von BUB1B, sowohl das Protein, als auch seine RNA, in Prostatakarzinomen mit einer erhöhten Progression und einem schlechteren klinischen Verlauf der Erkrankung einhergehen⁷⁰. Das bedeutet bub1b hat hier eine onkogene Funktion. Dies zeigte sich auch in unserem Mausmodell durch die unterschiedlichen Inzidenzen der Tumorentitäten abhängig vom bub1b-Status.

Möglich ist, dass eine primäre Heterozygotie für bub1b in Tumoren zu einer primären Resistenz gegenüber Docetaxel führt oder eine Selektion bub1b heterozygoter Klone unter Docetaxelstress verantwortlich für eine sekundäre Resistenz ist. In diesem Zusammenhang wurde bei einer kleineren Kohorte von sechs Patienten mittels RNA-Sequenzierung aus Prostatastanzbiopsien vor und nach einer Therapie mit Docetaxel und einem zusätzlichen Androgenentzug gezeigt, dass ein Defekt in den Genen des MSCs, unter anderem auch bub1b, mit einer signifikanten Verkürzung des erkrankungsfreien Überlebens in Zusammenhang steht⁷¹.

Da bereits die Haploinsuffizienz für bub1b zu Defekten im MSC führt, würden Tumore mit einer reduzierten Expression von bub1b eine schlechtere Aktivierung des MSC aufweisen. Dies kann der Tumorzelle ermöglichen, die Apoptose zu umgehen. Daher wäre dieser Mechanismus bei gleichzeitigem Defekt in p53 irrelevant, was sich in unseren Proliferationsversuchen (Siehe Abbildung 8) auch widerspiegelte.

Bei gleichzeitiger Homozygotie für p53 kann es aber unter Docetaxelstress zu einer schnelleren Entartung bzw. Progression des Tumors kommen und somit die Erfolgsaussichten einer Therapie mit Spindelgiften in Frage stellen.

Um diese Hypothesen zu klären, sind weitere Versuche und Analysen an Tumorzelllinien, -präparaten und Tiermodellen notwendig. Schlussendlich müssten die Ergebnisse auch mit klinischen Therapie- und Erkrankungsverläufen verknüpft werden.

Selbst wenn hier Zusammenhänge festgestellt werden können, bleibt die Frage, ob eine daraus resultierende Individualisierung der Tumorthherapie klinisch und wirtschaftlich relevant bzw. durchsetzbar ist.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Chemotherapeutika, deren Wirkung am MSC von Zellen ansetzen, gehören zum Standardrepertoire der onkologischen Therapie in zahlreichen Malignomen. In der Uroonkologie hat insbesondere das Erstarken von Docetaxel-basierten Therapien im metastasierten Prostatakarzinom den Fokus erneut auf den MSC gerichtet. Diesbezüglich wurden aber sowohl schützende, als auch tumortreibende Teilfunktionen des MSCs in verschiedenen Tumorentitäten gezeigt und pleiotrope Effekte einzelner Gene des MSCs näher untersucht. Die vorliegende Arbeit untersucht daher eine mögliche Rolle von *bub1b* in der Tumorentstehung und in der Modulation der Ansprechbarkeit gegenüber Docetaxel. Da die Heterozygotie im Gen *bub1b* in den existierenden Mausmodellen jedoch nur zu alters-assoziierten Tumorerkrankungen führt, wurden in Rahmen dieser Arbeit *bub1b* heterozygote Tiere mit *p53* defizienten Tieren verpaart. Eben diese Tiere wurden hinsichtlich ihres Überlebens sowie der Art der aufgetretenen Tumorentitäten untersucht. Zusätzlich wurden Proliferations- und Zellzyklusanalysen insbesondere unter Docetaxelstress an MEFs, die aus diesem Mausmodell gewonnen wurden, durchgeführt.

In Sektionsstudien des Mausmodells wurde gezeigt, dass bei gleichzeitigem Vorliegen von Heterozygotie von *bub1b* und Homozygotie von *p53* eine Verschiebung des Tumor-Phänotyps der *p53* defizienten Tiere (Sarkome und Lymphome) erfolgte. Tiere des Genotyps *bub1b* het / *p53* hom wiesen einen signifikant geringeren Anteil von Sarkomen im Vergleich zu den Lymphomen auf. Zusätzlich nahm bei den Lymphomen der Anteil von disseminierten Lymphomen gegenüber den thymoidalen Lymphomen zu. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass eine Heterozygotie für *bub1b* die Entwicklung bestimmter Tumorentitäten (disseminierte Lymphome) begünstigt, während andere Tumorentitäten (z.B. Sarkome) durch den Verlust eines *bub1b* Allels eher verhindert werden. Die molekularen Ursachen für diesen Befund sind zurzeit noch unklar.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurde unter Verwendung von Zellkulturen muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs), die mittels des vorhandenen Mausmodells etabliert wurden, gezeigt, dass MEFs der Genotypen *bub1b* wt / *p53* hom, wie auch *bub1b* het / *p53* hom im Vergleich zur Kontrollgruppe normal proliferieren und einen weitgehend normalen Zellzyklus aufweisen. Die zytostatische Wirkung des „Spindelcheckpoint Aktivators“ Docetaxel ist in MEFs mit einer Heterozygotie für *bub1b* reduziert, während MEFs der Genotypen *bub1b* wt / *p53* hom, wie auch *bub1b* het / *p53* hom sensitiver auf

Docetaxel reagieren. Aus diesen Ergebnissen kann eine geringe Effektivität von Docetaxel als zytostatisches Therapeutikum in der Tumorthherapie von bub1b heterozygoten Zellen abgeleitet werden. Bei gleichzeitigen Defekten im Gen p53 könnten sich bub1b heterozygote Zellen allerdings sensitiv gegenüber einer Therapie verhalten.

In MEFs aller drei Genotypen konnte zudem gezeigt werden, dass die Aktivierung des MSCs durch Docetaxel unvollständig bzw. defekt ist. Dieser Defekt im MSC führt, wie bereits erwähnt, zu einem starken zytostatischen Effekt, aber auch zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl und zur Persistenz von polyploiden Zellen in den Zellkulturen der MEFs mit dem Genotyp bub1b het / p53 hom. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass eine Defizienz für p53 und eine Heterozygotie für bub1b einen additiven Effekt in der Entwicklung von polyploiden Zellen besitzen und somit die Entwicklung von Tumorvorstufen begünstigen.

Ob diese Effekte auch in nativen Tumoren unter Docetaxel-Behandlung eine Rolle spielen und sich bub1b und p53 als mögliche Prädiktoren einer Docetaxel-Therapie im Menschen evaluieren lassen, müssten weiterführende Analysen zeigen, die den Verlauf einer Tumorthherapie mit Hilfe eines Spindelgiftes abbilden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Koch-Institut, R. Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe (2013).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674 (2011).
3. Marquardt, H. Lehrbuch der Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 3., 1483 (2013).
4. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70 (2000).
5. Munk, K. Grundstudium Biologie – Biochemie, Zellbiologie, Ökologie, Evolution. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin (2000).
6. Kops, G.J., Weaver, B.A. & Cleveland, D.W. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature reviews. Cancer* 5, 773-785 (2005).
7. Duesberg, P. Das Chaos in den Chromosomen. *Spektrum der Wissenschaft* (10/07).
8. Storchova, Z. & Pellman, D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5, 45-54 (2004).
9. Nigg, E.A. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nature reviews. Cancer* 2, 815-825 (2002).
10. McGrew, J.T., Goetsch, L., Byers, B. & Baum, P. Requirement for ESP1 in the nuclear division of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 3, 1443-1454 (1992).
11. Uzawa, S., Samejima, I., Hirano, T., Tanaka, K. & Yanagida, M. The fission yeast *cut1+* gene regulates spindle pole body duplication and has homology to the budding yeast ESP1 gene. *Cell* 62, 913-925 (1990).
12. Yamamoto, A., Guacci, V. & Koshland, D. Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* 133, 85-97 (1996).

13. Cimini, D., et al. Merotelic Kinetochores Orientation Is a Major Mechanism of Aneuploidy in Mitotic Mammalian Tissue Cells. *The Journal of cell biology* 153, 517-528 (2001).
14. Gardner, R.J.M., Sutherland, G.R. & Shaffer, L.G. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*, (2004).
15. Yasutis, K.M. & Kozminski, K.G. Cell cycle checkpoint regulators reach a zillion. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 12, 1501-1509 (2013).
16. Jia, L., Kim, S. & Yu, H. Tracking spindle checkpoint signals from kinetochores to APC/C. *Trends in biochemical sciences* 38, 302-311 (2013).
17. Skoufias, D.A., Andreassen, P.R., Lacroix, F.B., Wilson, L. & Margolis, R.L. Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle-attachment and kinetochore-tension checkpoints. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 4492-4497 (2001).
18. Cleveland, D.W., Mao, Y. & Sullivan, K.F. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* 112, 407-421 (2003).
19. Taylor, S.S., Scott, M.I. & Holland, A.J. The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 12, 599-616 (2004).
20. Visintin, R., Prinz, S. & Amon, A. CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science (New York, N.Y.)* 278, 460-463 (1997).
21. Fang, G., Yu, H. & Kirschner, M.W. Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Molecular cell* 2, 163-171 (1998).
22. King, R.W., Deshaies, R.J., Peters, J.M. & Kirschner, M.W. How proteolysis drives the cell cycle. *Science (New York, N.Y.)* 274, 1652-1659 (1996).

23. Sudakin, V., et al. The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Molecular biology of the cell* 6, 185-197 (1995).
24. Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry* 67, 425-479 (1998).
25. Hoyt, M.A., Totis, L. & Roberts, B.T. *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* 66, 507-517 (1991).
26. Roberts, B.T., Farr, K.A. & Hoyt, M.A. The *Saccharomyces cerevisiae* checkpoint gene BUB1 encodes a novel protein kinase. *Molecular and cellular biology* 14, 8282-8291 (1994).
27. Li, R. & Murray, A.W. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 66, 519-531 (1991).
28. Hardwick, K.G. & Murray, A.W. Mad1p, a phosphoprotein component of the spindle assembly checkpoint in budding yeast. *The Journal of cell biology* 131, 709-720 (1995).
29. Weiss, E. & Winey, M. The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene MPS1 is part of a mitotic checkpoint. *The Journal of cell biology* 132, 111-123 (1996).
30. Wang, Y. & Burke, D.J. Cdc55p, the B-type regulatory subunit of protein phosphatase 2A, has multiple functions in mitosis and is required for the kinetochore/spindle checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 17, 620-626 (1997).
31. Chen, R.H., Waters, J.C., Salmon, E.D. & Murray, A.W. Association of spindle assembly checkpoint component XMAD2 with unattached kinetochores. *Science (New York, N.Y.)* 274, 242-246 (1996).
32. Li, Y. & Benezra, R. Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science (New York, N.Y.)* 274, 246-248 (1996).

33. Taylor, S.S. & McKeon, F. Kinetochores localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell* 89, 727-735 (1997).
34. Chan, G.K., Jablonski, S.A., Sudakin, V., Hittle, J.C. & Yen, T.J. Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. *The Journal of cell biology* 146, 941-954 (1999).
35. Taylor, S.S., Ha, E. & McKeon, F. The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *The Journal of cell biology* 142, 1-11 (1998).
36. Mao, Y., Abrieu, A. & Cleveland, D.W. Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1. *Cell* 114, 87-98 (2003).
37. Chan, G.K., Jablonski, S.A., Starr, D.A., Goldberg, M.L. & Yen, T.J. Human Zw10 and ROD are mitotic checkpoint proteins that bind to kinetochores. *Nature cell biology* 2, 944-947 (2000).
38. Gorbsky, G.J., Chen, R.H. & Murray, A.W. Microinjection of antibody to Mad2 protein into mammalian cells in mitosis induces premature anaphase. *The Journal of cell biology* 141, 1193-1205 (1998).
39. Dai, W., et al. Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency. *Cancer research* 64, 440-445 (2004).
40. Babu, J.R., et al. Rae1 is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation. *The Journal of cell biology* 160, 341-353 (2003).
41. Michel, L.S., et al. MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* 409, 355-359 (2001).
42. Baker, D.J., et al. BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nature genetics* 36, 744-749 (2004).
43. Wang, Q., et al. BUBR1 deficiency results in abnormal megakaryopoiesis. *Blood* 103, 1278-1285 (2004).

44. Kuehn, D. Mikrosatelliteninstabilitäten und Defekte in den Spindelcheckpointgenen Bub1b und MAD2 als mögliche prädiktive Marker für das Prostatakarzinom. Universität Wuerzburg, Medizinische Fakultät (2009).
45. Zhou, H., et al. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nature genetics* 20, 189-193 (1998).
46. Fukasawa, K., Choi, T., Kuriyama, R., Rulong, S. & Vande Woude, G.F. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science (New York, N.Y.)* 271, 1744-1747 (1996).
47. Deng, C.X. Roles of BRCA1 in centrosome duplication. *Oncogene* 21, 6222-6227 (2002).
48. Chun, A.C. & Jin, D.Y. Transcriptional regulation of mitotic checkpoint gene MAD1 by p53. *The Journal of biological chemistry* 278, 37439-37450 (2003).
49. Iwanaga, Y. & Jeang, K.T. Expression of mitotic spindle checkpoint protein hsMAD1 correlates with cellular proliferation and is activated by a gain-of-function p53 mutant. *Cancer research* 62, 2618-2624 (2002).
50. Kienitz, A., Vogel, C., Morales, I., Muller, R. & Bastians, H. Partial downregulation of MAD1 causes spindle checkpoint inactivation and aneuploidy, but does not confer resistance towards taxol. *Oncogene* 24, 4301-4310 (2005).
51. Guo, Y., Kim, C., Ahmad, S., Zhang, J. & Mao, Y. CENP-E--dependent BubR1 autophosphorylation enhances chromosome alignment and the mitotic checkpoint. *The Journal of cell biology* 198, 205-217 (2012).
52. Akhoundi, F., Parvaneh, N. & Modjtaba, E.B. In silico analysis of deleterious single nucleotide polymorphisms in human BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B gene. *Meta gene* 9, 142-150 (2016).
53. Lane, D.P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16 (1992).
54. Poremba, C., Bankfalvi, A. & Dockhorn-Dworniczak, B. [Tumor suppressor gene p53. Theoretical principles and their significance for pathology]. *Der Pathologe* 17, 181-188 (1996).

55. Donehower, L.A. The p53-deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies. *Seminars in cancer biology* 7, 269-278 (1996).
56. Front Matter. in *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (11., Überarbeitete Auflage) III (Urban & Fischer, Munich, 2013).
57. Kops, G.J., Foltz, D.R. & Cleveland, D.W. Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8699-8704 (2004).
58. Lengauer, C., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386, 623-627 (1997).
59. Schmid, M., et al. Mosaic variegated aneuploidy in mouse BubR1 deficient embryos and pregnancy loss in human. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 22, 375-392 (2014).
60. Jacks, T., et al. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Current biology : CB* 4, 1-7 (1994).
61. Holland, A.J. & Cleveland, D.W. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 478 (2009).
62. Jeganathan, K., Malureanu, L., Baker, D.J., Abraham, S.C. & van Deursen, J.M. Bub1 mediates cell death in response to chromosome missegregation and acts to suppress spontaneous tumorigenesis. *The Journal of cell biology* 179, 255-267 (2007).
63. Armstrong, J.F., Kaufman, M.H., Harrison, D.J. & Clarke, A.R. High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Current biology : CB* 5, 931-936 (1995).
64. Sah, V.P., et al. A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nature genetics* 10, 175-180 (1995).

65. Lozano, G. Mouse models of p53 functions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a001115 (2010).
66. Wan, X., et al. Identification of FoxM1/Bub1b signaling pathway as a required component for growth and survival of rhabdomyosarcoma. *Cancer research* 72, 5889-5899 (2012).
67. Robert Esther, M.R., Mark Bolander and Gobinda Sarkar. Impaired Bub1B mRNA expression is associated with osteogenic sarcoma. *American Association for Cancer Research* 65 (2005).
68. Dai, Y., et al. Screening and functional analysis of differentially expressed genes in EBV-transformed lymphoblasts. *Virology journal* 9, 77 (2012).
69. Barbosa, J., Nascimento, A.V., Faria, J., Silva, P. & Bousbaa, H. The spindle assembly checkpoint: perspectives in tumorigenesis and cancer therapy. *Frontiers in Biology* 6, 147-155 (2011).
70. Fu, X., et al. Overexpression of BUB1B contributes to progression of prostate cancer and predicts poor outcome in patients with prostate cancer. *OncoTargets and therapy* 9, 2211-2220 (2016).
71. Rajan, P., et al. Identification of a candidate prognostic gene signature by transcriptome analysis of matched pre- and post-treatment prostatic biopsies from patients with advanced prostate cancer. *BMC Cancer* 14, 977 (2014).

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Konzertierter Ablauf der Mitosephase und Einflussbereich des mitotischen Checkpoints ⁶	- 2 -
Abbildung 2 Schematische Darstellung des Spindel-Checkpoint (MSC) und der beteiligten Proteine in Abhängigkeit des Zellzyklus ⁶	- 4 -
Abbildung 3 Maus des Stammes C57BL/6 (Foto: The Jackson Laboratory, Bar Harbour, USA).....	- 11 -
Abbildung 4 Vererbungsschema zweier unabhängiger Gene (bub1b / p53).....	- 18 -
Abbildung 5 Genotyp-abhängiges Überleben von Mäusen der Genotypen bub1b wt / p53 wt, bub1b het / p53 wt, bub1b wt / p53 hom und bub1b het / p53 hom.....	- 24 -
Abbildung 6 Genotyp-abhängiges Auftreten definierter Tumorentitäten (Lymphome und Sarkome) bei den untersuchten Mäusen mit Tumoren.....	- 25 -
Abbildung 7 Genotyp-abhängige Zellproliferation MEFs im zeitlichen Verlauf.....	- 28 -
Abbildung 8 Genotyp-abhängige Inhibition der Zellproliferation MEFs in Abhängigkeit von der Dauer der Docetaxel-Inkubation (0,01 mg/ml)	- 29 -
Abbildung 9 Relative Zellzahlen in den Phasen des Zellzyklus unterschiedlicher Genotypen ohne Docetaxel-Inkubation.....	- 31 -
Abbildung 10 Beispiel der Phasenverschiebung des Zellzyklus bei unterschiedlichen Docetaxel-Inkubationszeiten	- 32 -
Abbildung 11 Beispiel der Phasenverschiebung des Zellzyklus bei unterschiedlichen Docetaxel-Inkubationszeiten	- 33 -
Abbildung 12 Beispiel der Phasenverschiebung des Zellzyklus bei unterschiedlichen Docetaxel-Inkubationszeiten	- 33 -
Abbildung 13 Beispiel der Phasenverschiebung des Zellzyklus bei unterschiedlichen Docetaxel-Inkubationszeiten	- 34 -
Abbildung 14 Relative Zellzahlen in den Phasen des Zellzyklus unterschiedlicher Genotypen nach 24 Stunden Docetaxel-Inkubationszeit.....	- 34 -
Abbildung 15 Relative Zellzahlen in den Phasen des Zellzyklus unterschiedlicher Genotypen nach 72 Stunden Docetaxel-Inkubationszeit.....	- 36 -
Abbildung 16 Relative Zellzahlen unterschiedlicher Genotypen in der G ₁ -Phase des Zellzyklus zu unterschiedlichen Docetaxel-Inkubationszeiten	- 37 -

Abbildung 17 Relative Zellzahlen unterschiedlicher Genotypen in der G₂-/Meta-Phase des Zellzyklus zu unterschiedlichen Docetaxel-Inkubationszeiten - 37 -

Abbildung 18 Relative Zellzahlen unterschiedlicher Genotypen in der Polyploidie zu unterschiedlichen Docetaxel-Inkubationszeiten - 38 -

Abbildung 19 Relative Zellzahlen unterschiedlicher Genotypen in der S-Phase des Zellzyklus zu unterschiedlichen Docetaxel-Inkubationszeiten - 38 -

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Zusammensetzung des verwendeten PCR-Ansatzes zur Detektion von p53	- 16 -
Tabelle 2 Zusammensetzung des verwendeten PCR-Ansatzes zur Detektion von bub1b	- 17 -
Tabelle 3 Kreuzungsmatrix zweier für jeweils ein Gen (p53 bzw. bub1b) heterozygoten Knockout-Mäuse	- 17 -
Tabelle 4 Kreuzungsmatrix zweier für beide Gene (p53 und bub1b) heterozygoten Knockout-Mäuse	- 18 -
Tabelle 5 Tabellarische Darstellung der Anzahl der Tumorentitäten im Mauskollektiv	- 26 -
Tabelle 6 Tabellarische Darstellung der durchschnittlichen Lebensalter im Mauskollektiv	- 26 -
Tabelle 7 Tabellarische Darstellung der Anzahl der unterschiedlichen Genotypen der Embryonen eines Zuchtpaares mit den Genotypen bub1b het / p53 hom und bub1b het / p53 hom	- 27 -
Tabelle 8 Tabellarische Darstellung der Anzahl der unterschiedlichen Genotypen der Embryonen eines Zuchtpaares mit den Genotypen bub1b het / p53 wt und bub1b het / p53 wt	- 28 -

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater und einem meiner klinischen Lehrer Herrn Prof. Dr. med. Elmar Gerharz für die Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit bedanken.

Großer Dank gilt Herrn Dr. med. vet. Burkhard Kneitz, der als Leiter des urologischen Forschungslabors mir alle angewandten Methoden in den Laboren im Universitätsklinikum und im Biozentrum der Universität Würzburg erst ermöglichte. Des Weiteren stand er mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Ohne seine große Geduld und Expertise wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Für die Unterstützung im Tierstall und bei den Zellzyklusanalysen danke ich Frau Dr. rer. nat. Cora Reiß, aus der Arbeitsgruppe von Dr. med. vet. Burkhard Kneitz im Biozentrum der Universität Würzburg.

Dem Institut für Humangenetik der Universität Würzburg danke ich für die Bereitstellung des Durchflusszytometers.

Frau Vera Schwartz, Frau Barbara Dexler und Frau Katrin Borschert danke ich sowohl für die fundierte Einarbeitung in PCR und Zellkultur, als auch für die liebevolle Unterstützung während der gemeinsamen Zeit im Labor.

Darüber hinaus danke ich meiner Familie und Freunden für die große Geduld und Unterstützung beim Abschluss dieser Arbeit.