

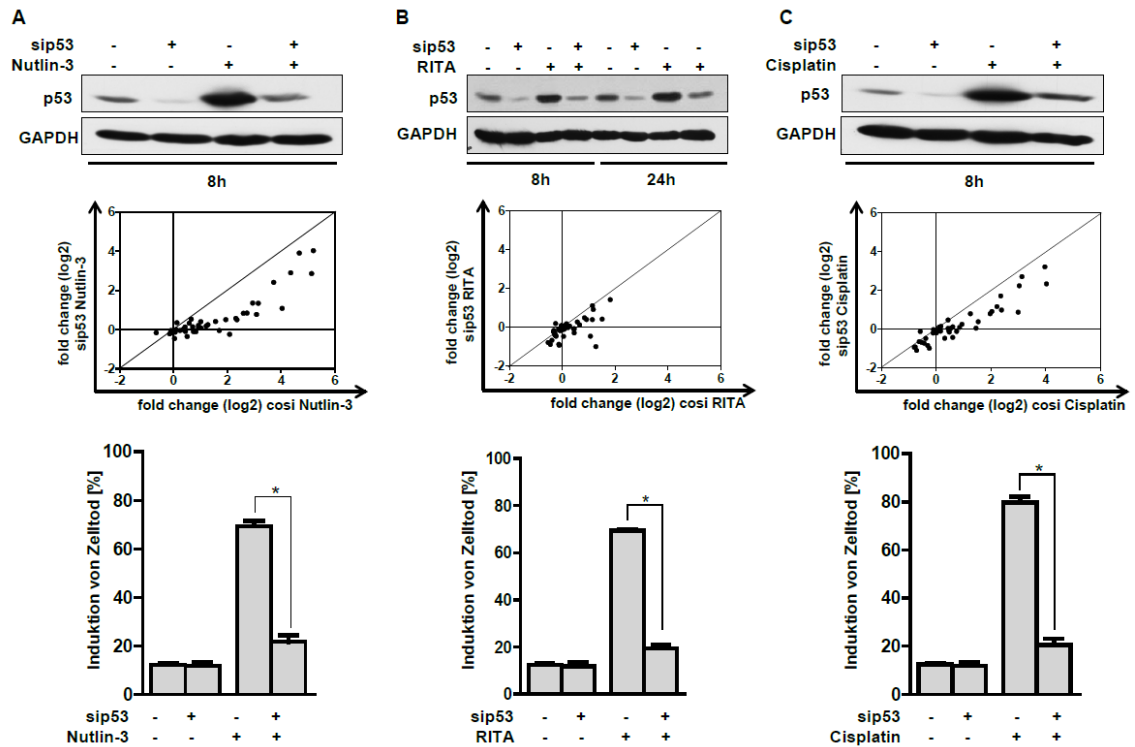
**Erratum** zur Dissertation „Die Rolle des p53-Status für die Sensitivität von Tumoren gegenüber unterschiedlichen p53 Aktivatoren“ vorgelegt von Andrea Weilbacher, 2014.

Bei der Erstellung der Western-Blot-Abbildungen wurden versehentlich Scans von Western-Blots mehrfach verwendet bzw. vertauscht. Es handelt sich dabei überwiegend um Beladungskontrollen für Western-Blots, die die Effizienz von siRNA-vermittelten Knockdowns eines Proteins belegen. Die nachfolgenden Korrekturen enthalten nun die korrekten Western-Blots, die alle auch im Original noch vorhanden sind. Diese Korrekturen haben keinerlei Auswirkungen auf die Ergebnisse oder die daraus gezogenen Schlussfolgerungen dieser Doktorarbeit.

[Stand 25.07.2017]

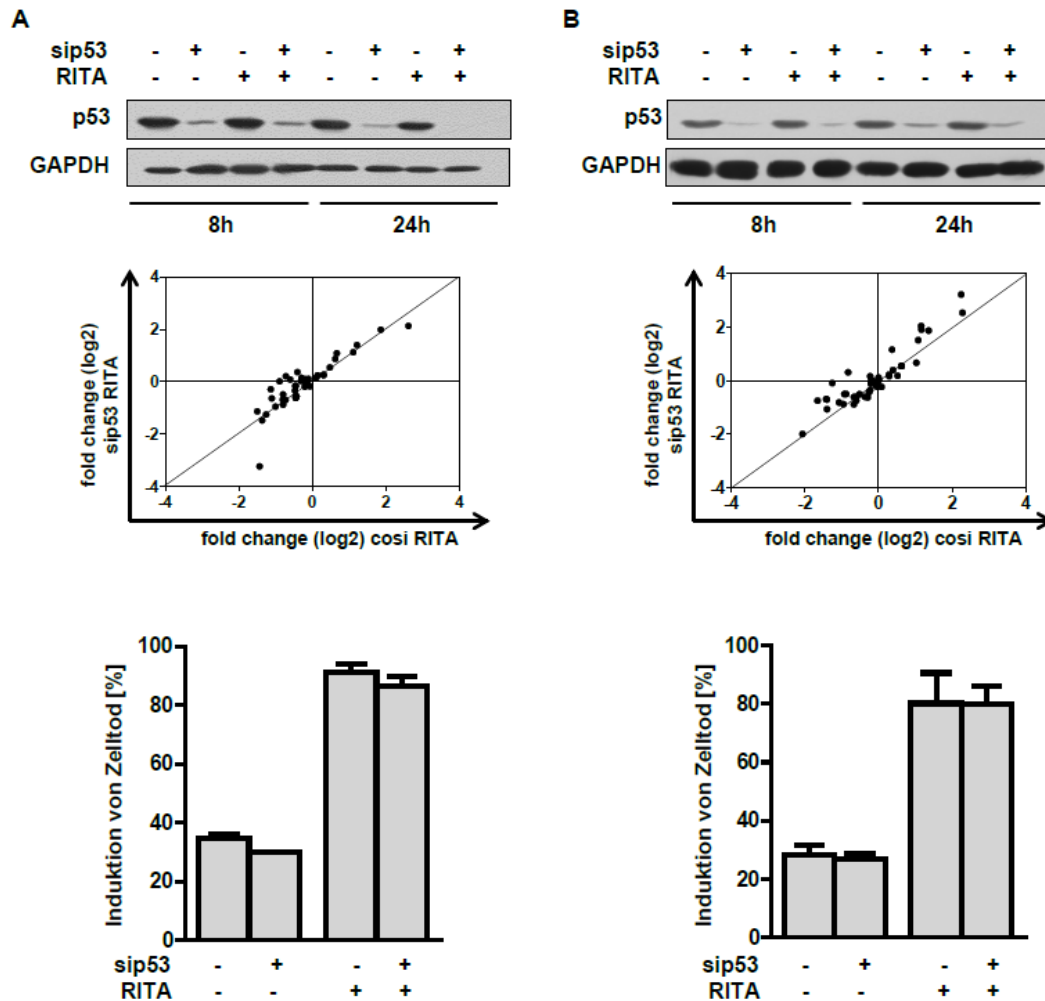
## Korrekturen:

- Abb. 3.5: Der GAPDH Western Blot (Abb. 3.5B) sowie die Legende wurden korrigiert.



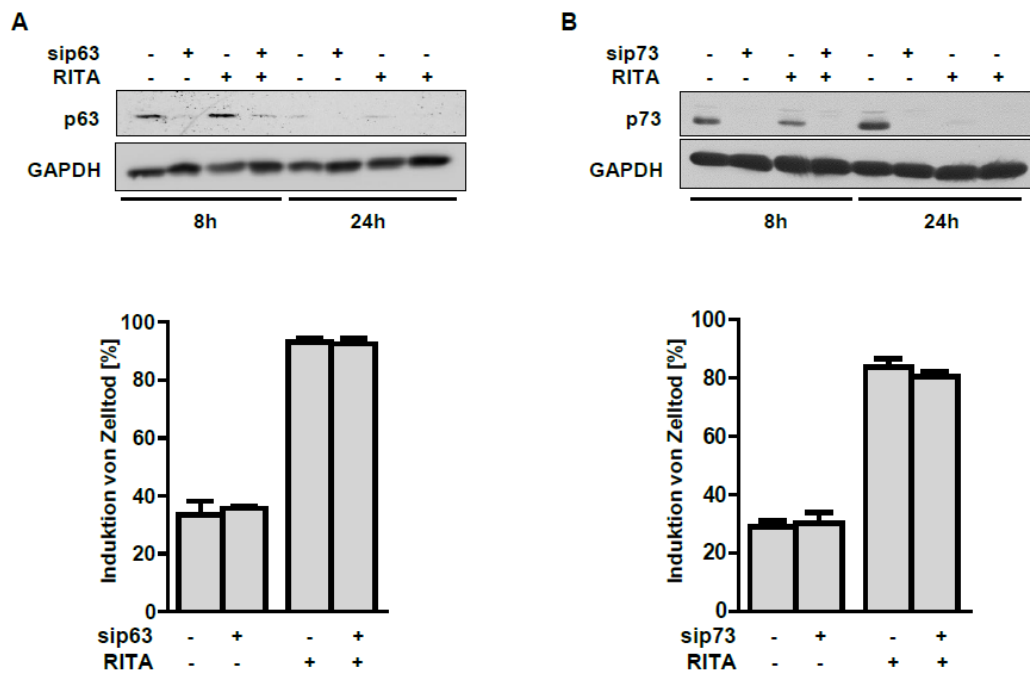
**Abbildung 3.5:** Die siRNA-vermittelte Depletion von wtp53 führt zu einer Verminderung des Zelltods sowohl nach (A) Nutlin-3-, (B) RITA- und (C) Cisplatin-Behandlung in NTERA-2D1. 1. Zeile: Überprüfung der Effizienz des Knockdowns mittels Western-Blot. 2. Zeile: Differentielle Expression der 45 *bona fide* p53-Zielgene nach Nutlin-3-, RITA- und Cisplatin-Behandlung. Nach 8 h Inkubation mit und ohne Nutlin-3, RITA oder Cisplatin erfolgte die Isolation der RNA mit anschließender Genexpressionsanalyse. Die Diagramme zeigen die log<sub>2</sub> ΔΔCt-Werte der Kontrolle (x-Achse) aufgetragen gegen die log<sub>2</sub> ΔΔCt-Werte nach TP53-Knockdown (y-Achse). Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert des p53-Zielgens aus drei unabhängigen Experimenten. 3. Zeile: 48 h nach Inkubation wurden die Zellen mit AnnexinV-FITC/PI-Färbung gefärbt und der Zelltod im Durchflusszytometer gemessen. Jeder Balken repräsentiert das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten ±SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweiseitigem, gepaartem t-Test berechnet und p-Werte < 0,05 mit (\*) gekennzeichnet.

- Abb. 3.7: Der GAPDH Western Blot (Abb. 3.7B) sowie die Legende wurden korrigiert.



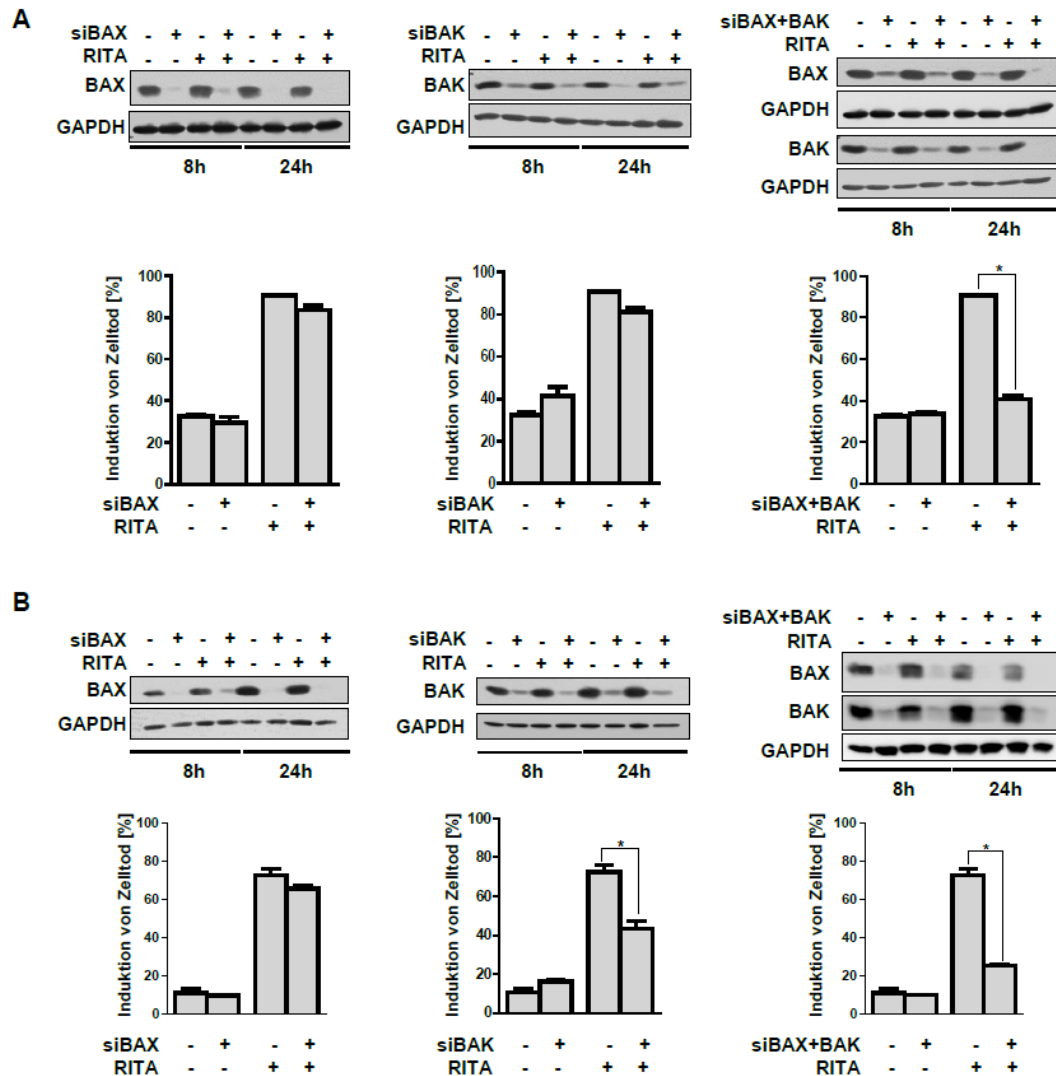
**Abbildung 3.7:** RITA kann unabhängig von mtp53 Zelltod induzieren. Für die RNAi-Experimente wurden die mtp53-exprimierenden Zelllinien (A) OVCAR3 und (B) OVCAR4 verwendet. 1. Zeile: Überprüfung der Effizienz des *TP53*-Knockdowns mittels Western-Blot-Analyse. 2. Zeile: Differentielle Expression der 45 *bona fide* p53-Zielgene nach RITA-Behandlung. Nach 8 h Inkubation mit und ohne RITA erfolgte die Isolation der RNA mit anschließender Genexpressionsanalyse. Die Diagramme zeigen die log2  $\Delta\Delta$ Ct-Werte der Kontrolle (x-Achse) aufgetragen gegen die log2  $\Delta\Delta$ Ct-Werte nach *TP53* Knockdown (y-Achse). Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert des p53-Zielgens aus drei unabhängigen Experimenten. 3. Zeile: 48 h nach Inkubation mit und ohne RITA wurden die Zellen mit AnnexinV-FITC/PI-Färbung gefärbt und der Zelltod im Durchflusszytometer gemessen. Jeder Balken repräsentiert das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$ SD.

- Abb. 3.8: Die GAPDH Western Blots (Abb. 3.8A und B) sowie die Legende wurden korrigiert.



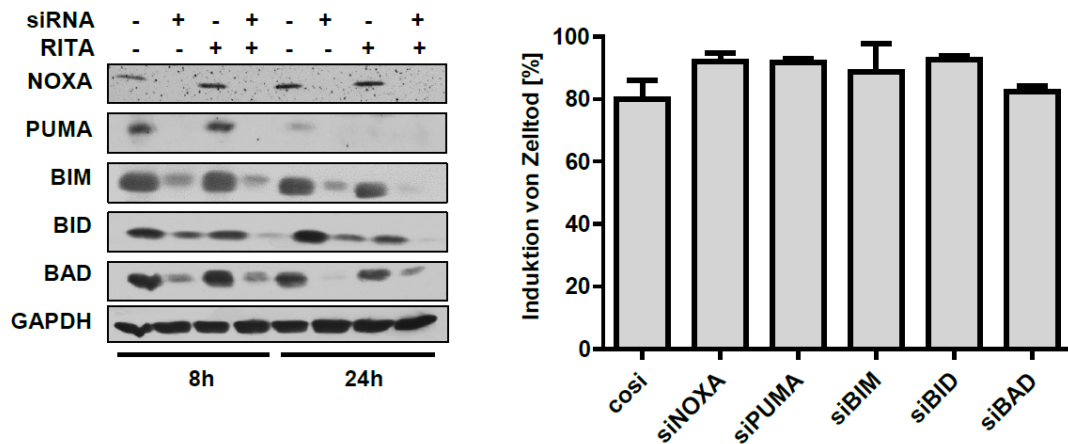
**Abbildung 3.8:** RITA kann unabhängig von p63 und p73 Zelltod induzieren. Für die Knockdown-Experimente wurde die mtp53-exprimierende Zelllinie OVCAR4 verwendet. 1. Zeile: Überprüfung der Effizienz des (A) *TP63*- und (B) *TP73*-Knockdowns mittels Western-Blot-Analyse. 2. Zeile: 48 h nach Inkubation mit und ohne RITA wurden die Zellen mit TMRM gefärbt und MOMP im Durchflusszytometer gemessen. Jeder Balken repräsentiert das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$ SD.

- Abb. 3.11: Die Western Blots in Abb. 3.5 A (links & mitte: BAX, BAK, GAPDH und rechts: GAPDH) sowie in B (links & mitte: GAPDH und rechts: BAX, BAK, GAPDH) wurden korrigiert. Die Legende wurde korrigiert.



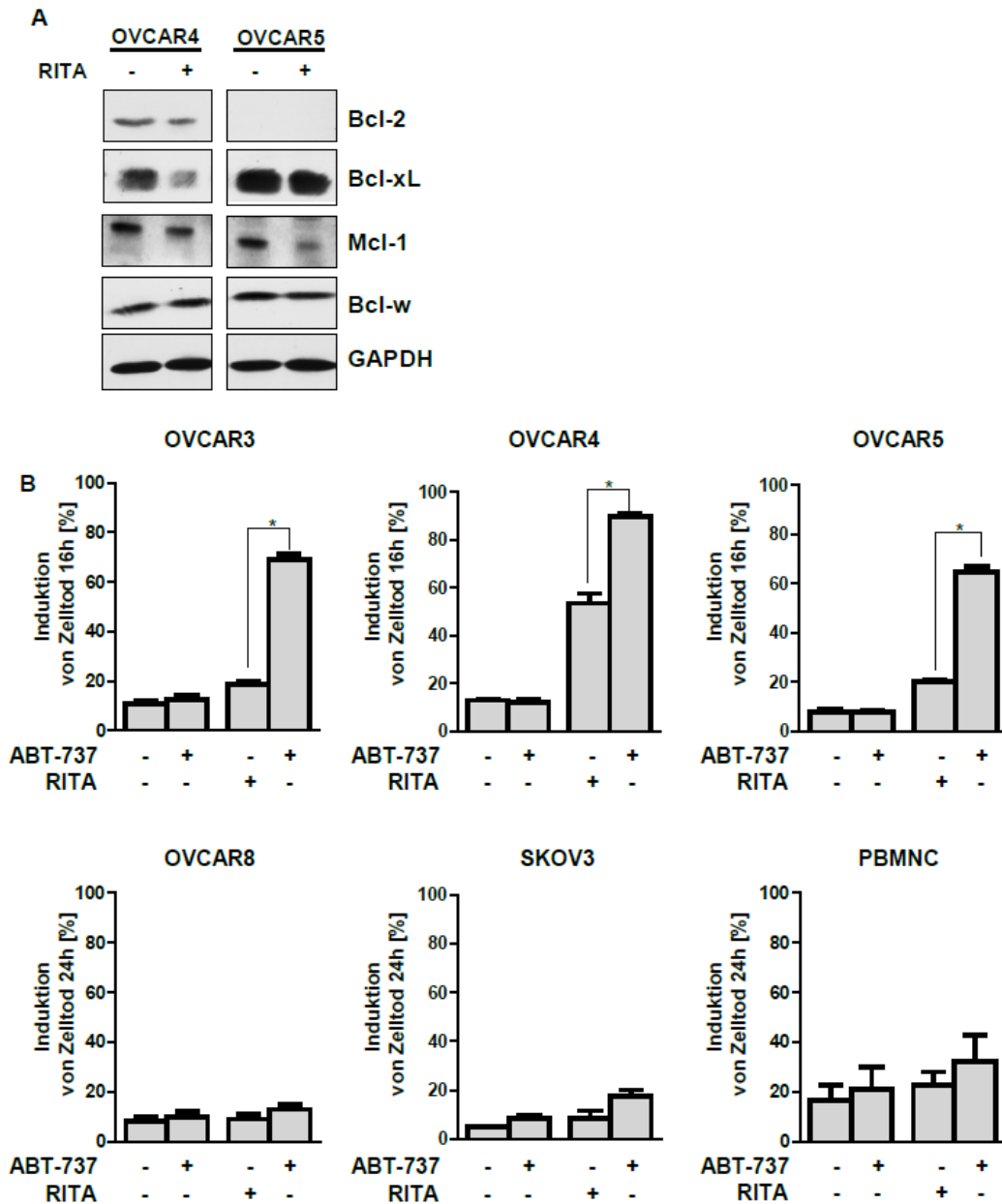
**Abbildung 3.11:** Induktion von MOMP durch RITA Behandlung. (A) Abhängigkeit der durch RITA induzierten mitochondrialen Permeabilisation von den porenbildenden Effektorproteinen BAX und BAK in der mtp53-exprimierenden Zelllinie OVCAR4. 1. Zeile: Überprüfung der Effizienz der Knockdowns mittels Western-Blot-Analyse. 2. Zeile: 48 h nach Behandlung mit und ohne RITA wurden die Zellen mit TMRM gefärbt und MOMP im Durchflusszytometer gemessen. Jeder Balken repräsentiert das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$ SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweiseitigem, gepaartem t-Test berechnet und p-Werte  $<0,05$  mit (\*) gekennzeichnet. (B) Abhängigkeit der durch RITA induzierten mitochondrialen Permeabilisation von den porenbildenden Effektorproteinen BAX und BAK in der p53-null-Linie OVCAR5. 1. Zeile: Überprüfung der Effizienz der Knockdowns mittels Western-Blot-Analyse. 2. Zeile: 48 h nach Inkubation mit und ohne RITA wurden die Zellen mit AnnexinV-FITC/PI-Färbung gefärbt und der Zelltod im Durchflusszytometer gemessen. Jeder Balken repräsentiert das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$ SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweiseitigem, gepaartem t-Test berechnet und p-Werte  $<0,05$  mit (\*) gekennzeichnet.

- Abb. 3.12: Der GAPDH Western Blot sowie die Legende wurden korrigiert.



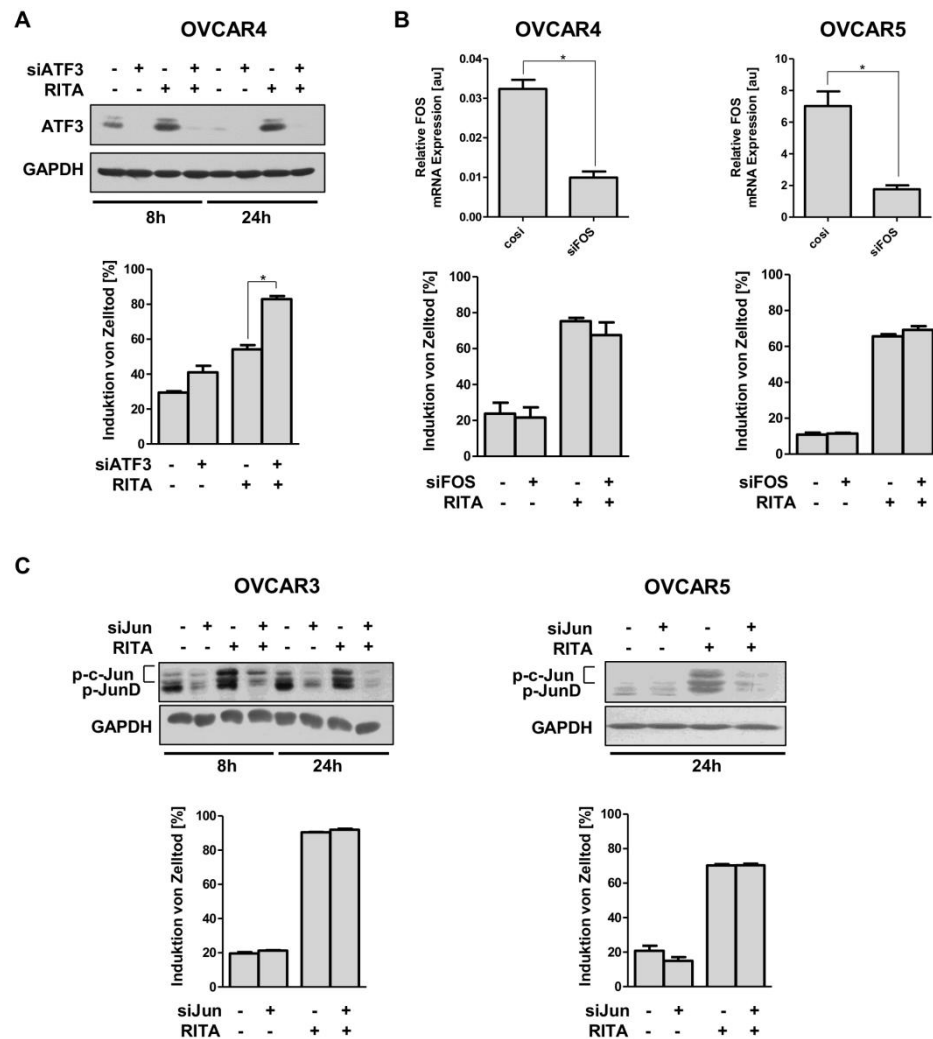
**Abbildung 3.12:** RITA kann unabhängig von NOXA, PUMA, BIM, BID und BAD Apoptose in der mtp53-Linie OVCAR4 induzieren. Links: Überprüfung der Effizienz der Knockdowns mittels Western-Blot-Analyse. Rechts: 48 h nach Inkubation mit und ohne RITA wurden die Zellen mit TMRM gefärbt und MOMP im Durchflusszytometer gemessen. Jeder Balken repräsentiert das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$ SD.

- Abb. 3.13: Der GAPDH Western Blot sowie die Legende wurden korrigiert.



**Abbildung 3.13:** RITA induziert die Herunterregulation anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine. (A) Western-Blot-Experimente zeigen die Proteinlevel der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w und Mcl-1 nach Inkubation der Ovarialkarzinom-Zelllinien OVCAR4 und OVCAR5 mit und ohne RITA nach 8 h Behandlung. (B) ABT-737, ein BH3-mimetic, wirkt synergistisch mit RITA in RITA-sensitiven Zellen. RITA-sensitive (1. Zeile) und RITA-insensitive Zellen (2. Zeile) wurden mit ABT-737 2 h vor RITA-Behandlung vorinkubiert. Nach 16 h (OVCAR3, OVCAR4, OVCAR5) oder 24 h (OVCAR8, SKOV3, PBMNC) wurden die Zellen mit TMRM gefärbt und die Depolarisierung der mitochondrialen Membran im Durchflusszytometer gemessen. Jeder Balken repräsentiert das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$ SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweiseitigem, gepaartem t-Test berechnet und p-Werte < 0,05 mittels (\*) gekennzeichnet.

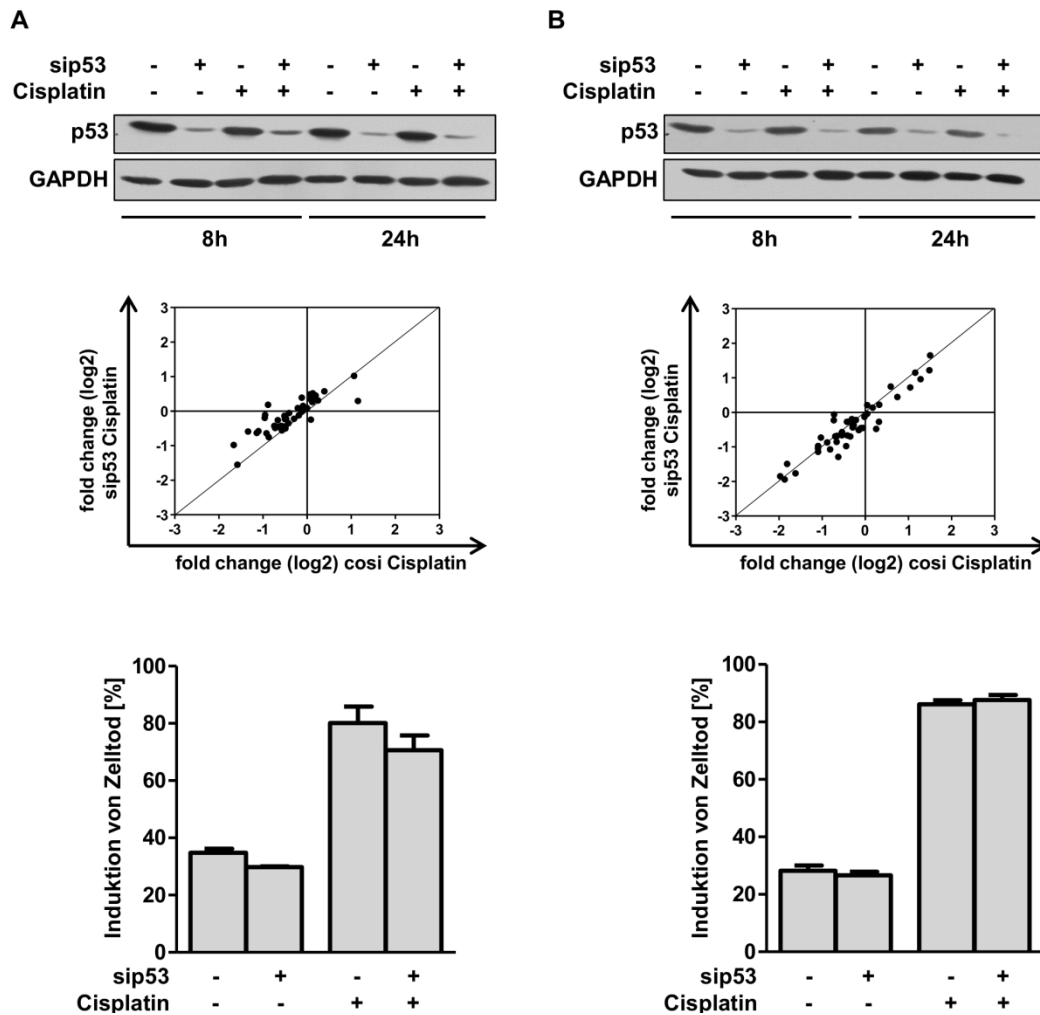
- Abb. 3.18: Die Legende wurde korrigiert.



**Abbildung 3.18:** Im p53-defekten System ist der RITA-induzierte Zelltod nicht von ATF3, FOS oder c-Jun abhängig. (A) Transfektion der mtp53-exprimierenden Zelllinie OVCAR4 mit ATF3-siRNA. Überprüfung der Effizienz des ATF3-Knockdowns mittels Western-Blot-Analyse. 16 h nach Inkubation mit und ohne RITA wurden die Zellen mit TMRM gefärbt und MOMP im Durchflusszytometer gemessen. Jeder Balken repräsentiert das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$ SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweiseitigem, gepaartem t-Test berechnet und p-Werte  $<0,05$  mit (\*) gekennzeichnet. (B) FOS-Knockdown in der mtp53-exprimierenden Linie OVCAR4 und der p53-null-Linie OVCAR5. Die Überprüfung der Knockdown-Effizienz wurde mittels qPCR durchgeführt. Dargestellt wurde die relative Expression von FOS aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$ SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweiseitigem, gepaartem t-Test berechnet und p-Werte  $<0,05$  mit (\*) gekennzeichnet. 48 h nach Inkubation mit und ohne RITA wurden die Zellen mit TMRM (OVCAR4) oder AnnexinV-FITC/PI-Färbung (OVCAR5) gefärbt und MOMP bzw. Zelltod im Durchflusszytometer gemessen. Jeder Balken repräsentiert das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$ SD. (C) c-Jun-Knockdown in der mtp53-exprimierenden Linie OVCAR3 und der p53-null-Linie OVCAR5. Überprüfung der Effizienz des c-Jun-Knockdowns mittels Western-Blot-Analyse. 48 h nach Inkubation mit und ohne RITA wurden die Zellen mit TMRM gefärbt und MOMP im Durchflusszytometer gemessen. Jeder Balken repräsentiert das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$ SD.

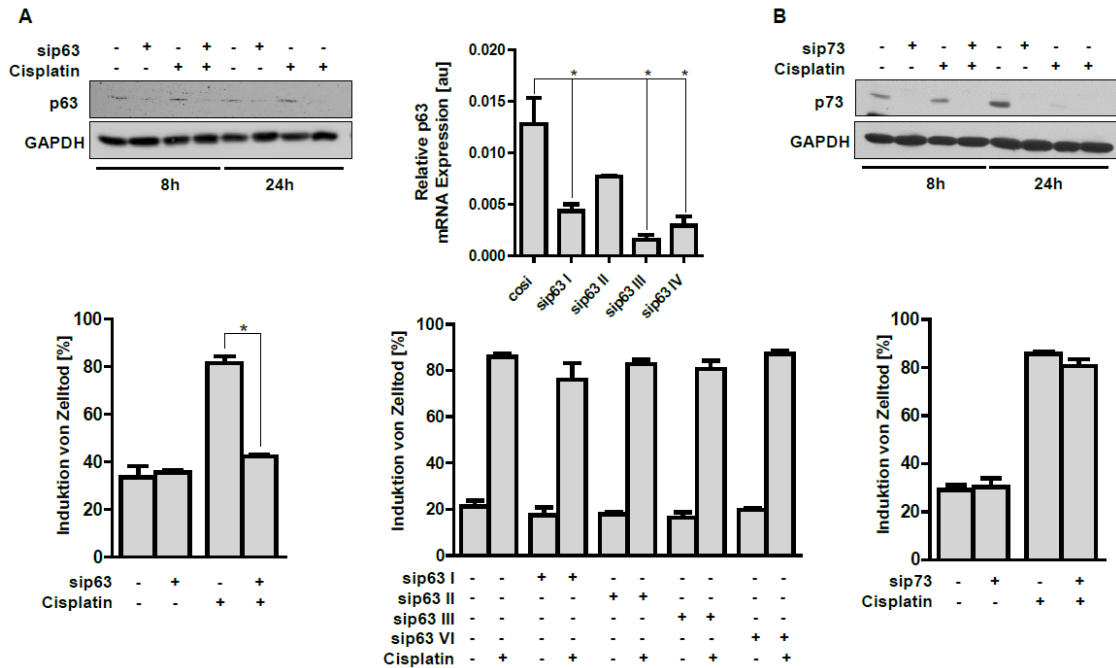


- Abb. 3.19: Die Legende wurde korrigiert.



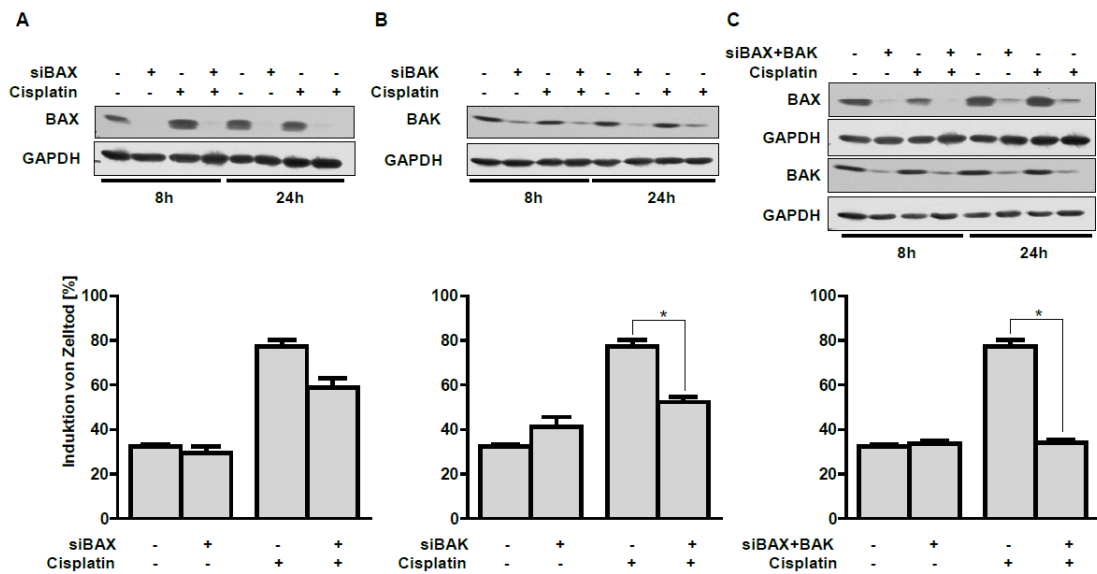
**Abbildung 3.19:** Cisplatin kann unabhängig von mtp53 Zelltod induzieren. Für die RNAi-Experimente wurden die mtp53-exprimierenden Zelllinien (A) OVCAR3 und (B) OVCAR4 verwendet. 1. Zeile: Überprüfung der Effizienz des *TP53*-Knockdowns mittels Western-Blot-Analyse. 2. Zeile: Differentielle Expression der 45 *bona fide* p53-Zielgene nach Cisplatin-Behandlung. Nach 8 h Inkubation mit und ohne Cisplatin erfolgte die Isolation der RNA mit anschließender Genexpressionsanalyse. Die Diagramme zeigen die  $\log_2 \Delta\Delta Ct$ -Werte der Kontrolle (x-Achse) aufgetragen gegen die  $\log_2 \Delta\Delta Ct$ -Werte nach *TP53* Knockdown (y-Achse). Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert des p53-Zielgens aus drei unabhängigen Experimenten. 3. Zeile: 48 h nach Inkubation mit und ohne Cisplatin wurden die Zellen mit AnnexinV-FITC/PI-Färbung gefärbt und der Zelltod im Durchflusszytometer gemessen. Jeder Balken repräsentiert das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$ SD.

- Abb. 3.20: Die GAPDH Western Blots (Abb. 3.20A und B) sowie die Legende wurden korrigiert.



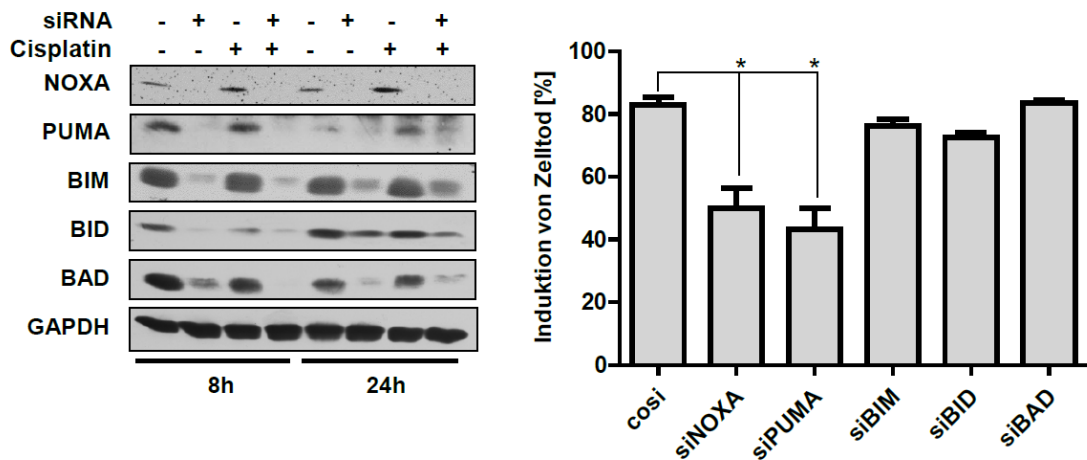
**Abbildung 3.20:** Cisplatin kann unabhängig von p63 und p73 Zelltod in der Linie OVCAR4 induzieren. (A) Knockdown von *TP63*. Links: Überprüfung der Effizienz des *TP63*-Knockdowns mittels Western-Blot-Analyse. 48 h nach Inkubation mit und ohne Cisplatin wurden die Zellen mit TMRM gefärbt und MOMP im Durchflusszytometer gemessen. Jeder Balken repräsentiert das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$ SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweiseitigem, gepaartem t-Test berechnet und p-Werte  $<0,05$  mit (\*) gekennzeichnet. Rechts: Knockdown von *TP63* mittels ON-TARGET siRNAs. Die Überprüfung der Knockdown-Effizienz wurde mittels qPCR durchgeführt. Dargestellt wurde die relative Expression von *TP63* aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$ SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweiseitigem, gepaartem t-Test berechnet und p-Werte  $<0,05$  mit (\*) gekennzeichnet. (B) Knockdown von *TP73*. Überprüfung der Effizienz des *TP73*-Knockdowns mittels Western-Blot-Analyse. 48 h nach Inkubation mit und ohne Cisplatin wurden die Zellen mit TMRM gefärbt und MOMP im Durchflusszytometer gemessen. Jeder Balken repräsentiert das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$ SD.

- Abb. 3.23: Die GAPDH Western Blots sowie die Legende wurden korrigiert.



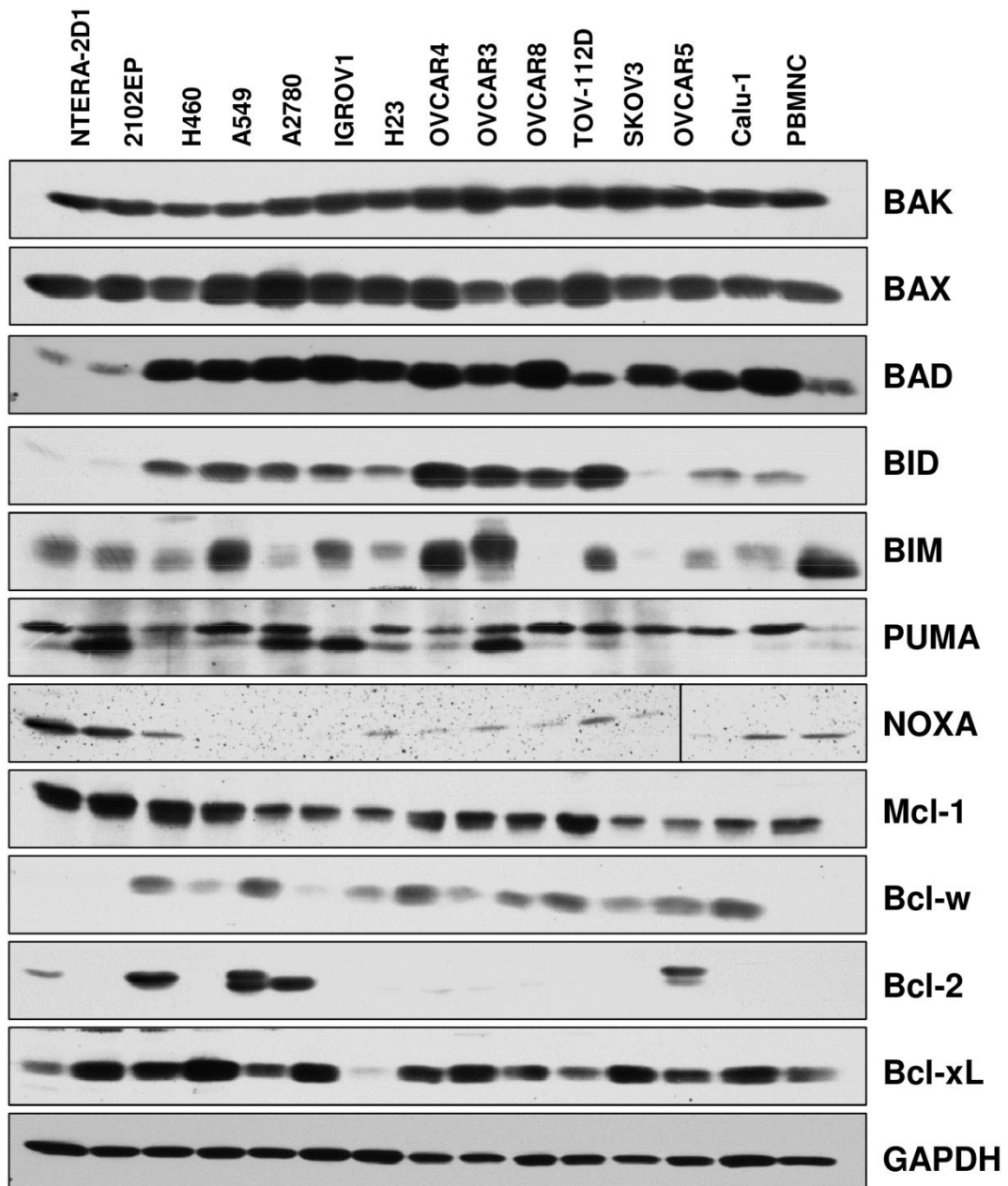
**Abbildung 3.23:** Induktion von MOMP durch Cisplatin Behandlung in der mtp53 Ovarialkarzinom-Zelllinie OVCAR4. Abhängigkeit der durch Cisplatin induzierten mitochondrialen Permeabilisation von (A) BAX (B) BAK und (C) BAX und BAK. 1. Zeile: Überprüfung der Effizienz der Knockdowns mittels Western-Blot-Analyse. 2. Zeile: 48 h nach Inkubation mit und ohne Cisplatin wurden die Zellen mit TMRM gefärbt und MOMP im Durchflusszytometer gemessen. Jeder Balken repräsentiert das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$ SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweiseitigem, gepaartem t-Test berechnet und p-Werte  $<0,05$  mittels (\*) gekennzeichnet.

- Abb. 3.24: Der GAPDH Western Blot sowie die Legende wurden korrigiert.



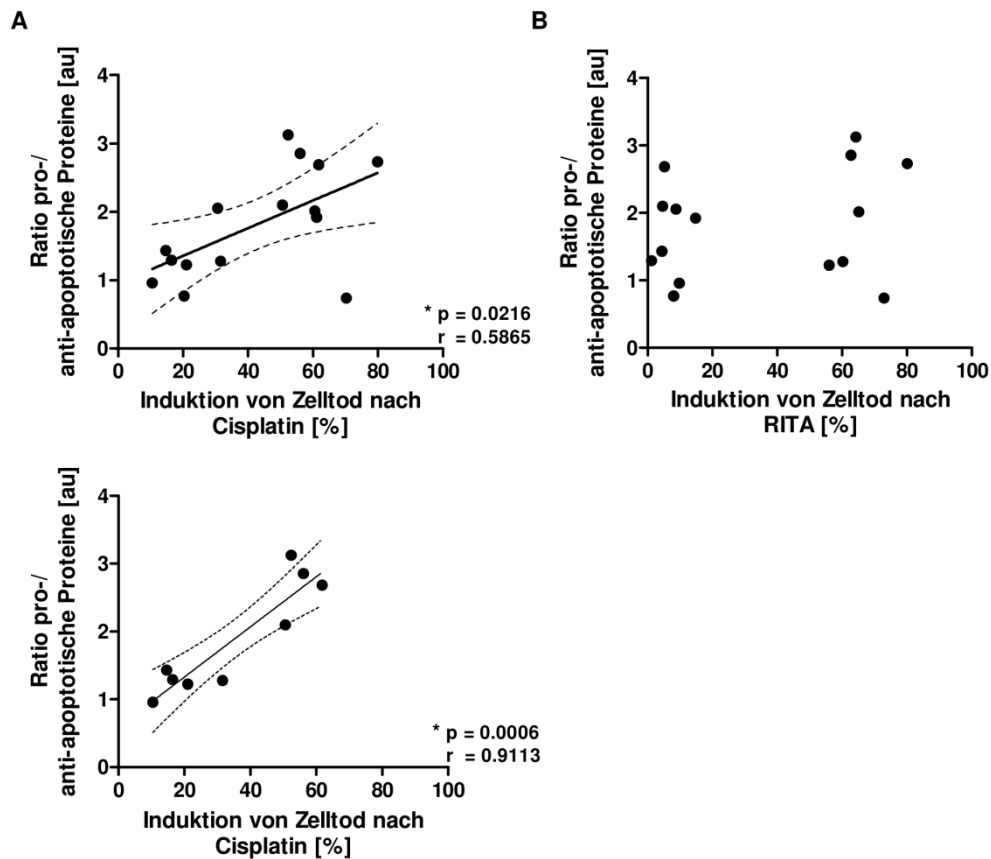
**Abbildung 3.24:** NOXA und PUMA sind wichtige Komponenten bei der Cisplatin-induzierten Apoptose in der mtp53-Linie OVCAR4. Links: Überprüfung der Effizienz der Knockdowns mittels Western-Blot-Analyse. Rechts: 48 h nach Inkubation mit und ohne Cisplatin wurden die Zellen mit TMRM gefärbt und MOMP im Durchflusszytometer gemessen. Jeder Balken repräsentiert das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$ SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweiseitigem, gepaartem t-Test berechnet und p-Werte  $<0,05$  mittels (\*) gekennzeichnet.

- Abb. 3.25: Die Legende wurde korrigiert.



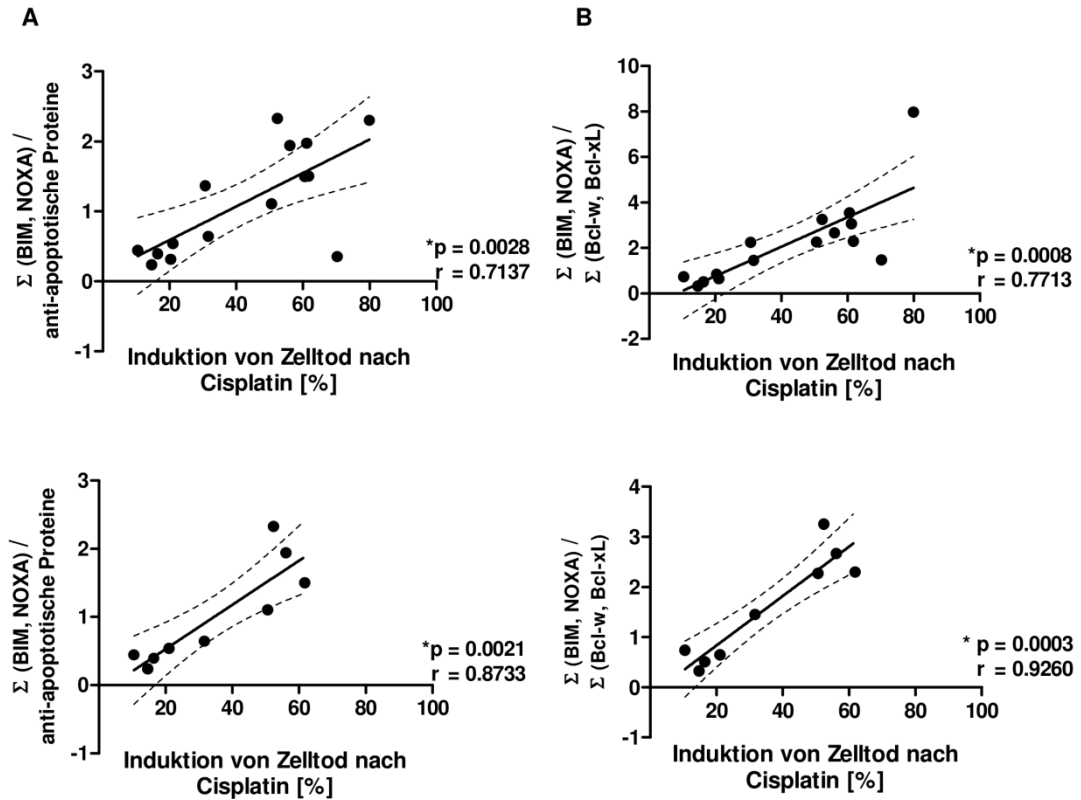
**Abbildung 3.25:** Konstitutive Expression der pro-apoptotischen Proteine BAK, BAX, BAD, BID, BIM, PUMA und NOXA sowie die der anti-apoptotischen Proteine Mcl-1, Bcl-w, Bcl-2 und Bcl-xL in der Zelllinienauswahl. Analyse der Proteinexpression aus Proteinlysaten von unbehandelten Proben der Zelllinien sowie von PBMNCs.

- Abb. 26: Die Legende wurde korrigiert.



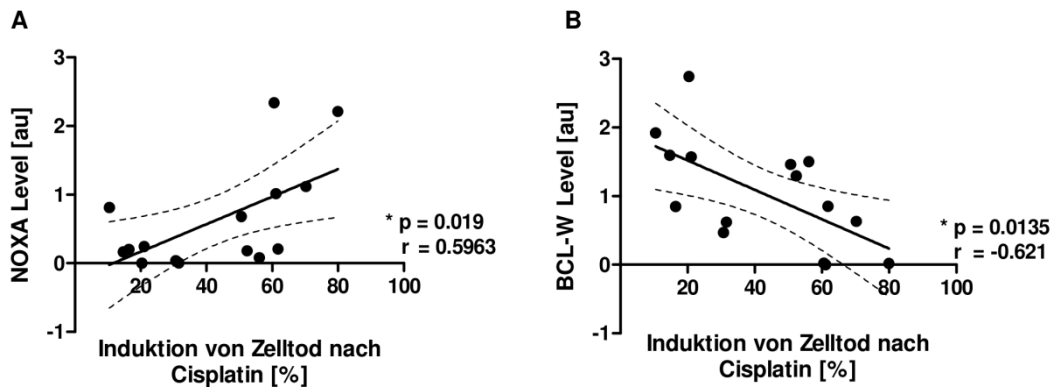
**Abbildung 3.26:** Signifikante Korrelation des Verhältnisses aus pro- und anti-apoptischen Bcl-2-Proteinen. Mit Hilfe der densitometrischen Auswertung der Western-Blot-Analyse wurde das Verhältnis aus pro- und anti-apoptischen Bcl-2-Proteinen berechnet und anschließend mit der Induktion von Zelltod nach (A) Cisplatin (1. Zeile: gesamte Zelllinienauswahl, 2. Zeile: Zelllinien mit mtp53) und (B) RITA korreliert (Pearson-Korrelation mit 95% Konfidenzintervall, p-Werte<0,05, r-Werte>0,5). Jeder Punkt steht stellvertretend für eine Zelllinie.

Abb. 3.27: Die Legende wurde korrigiert.



**Abbildung 3.27:** Reduktion der am Verhältnis beteiligten Bcl-2-Proteine zur Bestimmung der im Minimum notwendigen Komponenten für eine Korrelation. Mit Hilfe der densitometrischen Auswertung der Western-Blot-Analyse wurde das Verhältnis aus pro- und anti-apoptischen Bcl-2-Proteinen berechnet und anschließend die Anzahl der am Verhältnis beteiligten Proteine, (A) der pro-apoptischen, (B) der anti-apoptischen reduziert. Die Berechnung der Korrelation erfolgte durch eine Pearson-Korrelation mit 95% Konfidenzintervall (p-Werte < 0,05, r-Werte > 0,5). Jeder Punkt steht stellvertretend für eine Zelllinie.

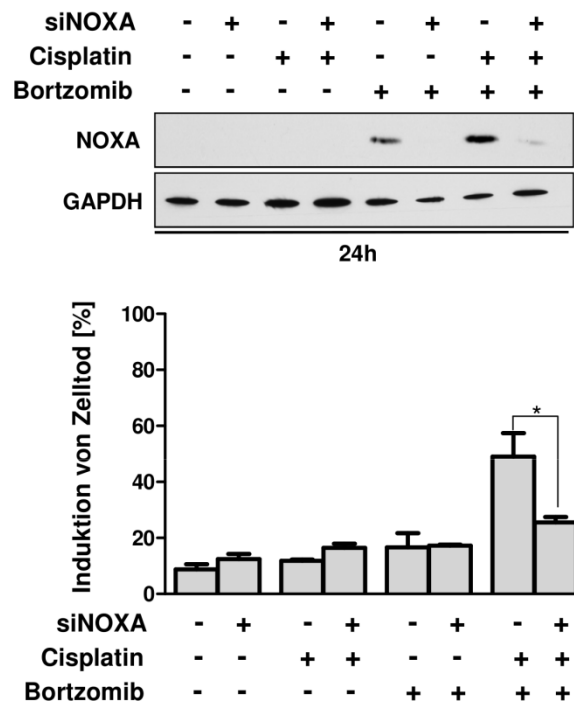
- Abb. 3.28: Die Legende wurde korrigiert.



**Abbildung 3.28:** Signifikante Korrelation des Verhältnisses von NOXA und Bcl-w mit dem Cisplatin-induzierten Zelltod. Mit Hilfe der densitometrischen Auswertung der Western-Blot-Analyse wurde das Expressionsniveau von (A) NOXA und (B) Bcl-w bestimmt und mit dem Cisplatin-induzierten Zelltod korreliert (Pearson-Korrelation mit 95% Konfidenzintervall, p-Werte < 0,05, r-Werte > 0,5). Jeder Punkt steht stellvertretend für eine Zelllinie.

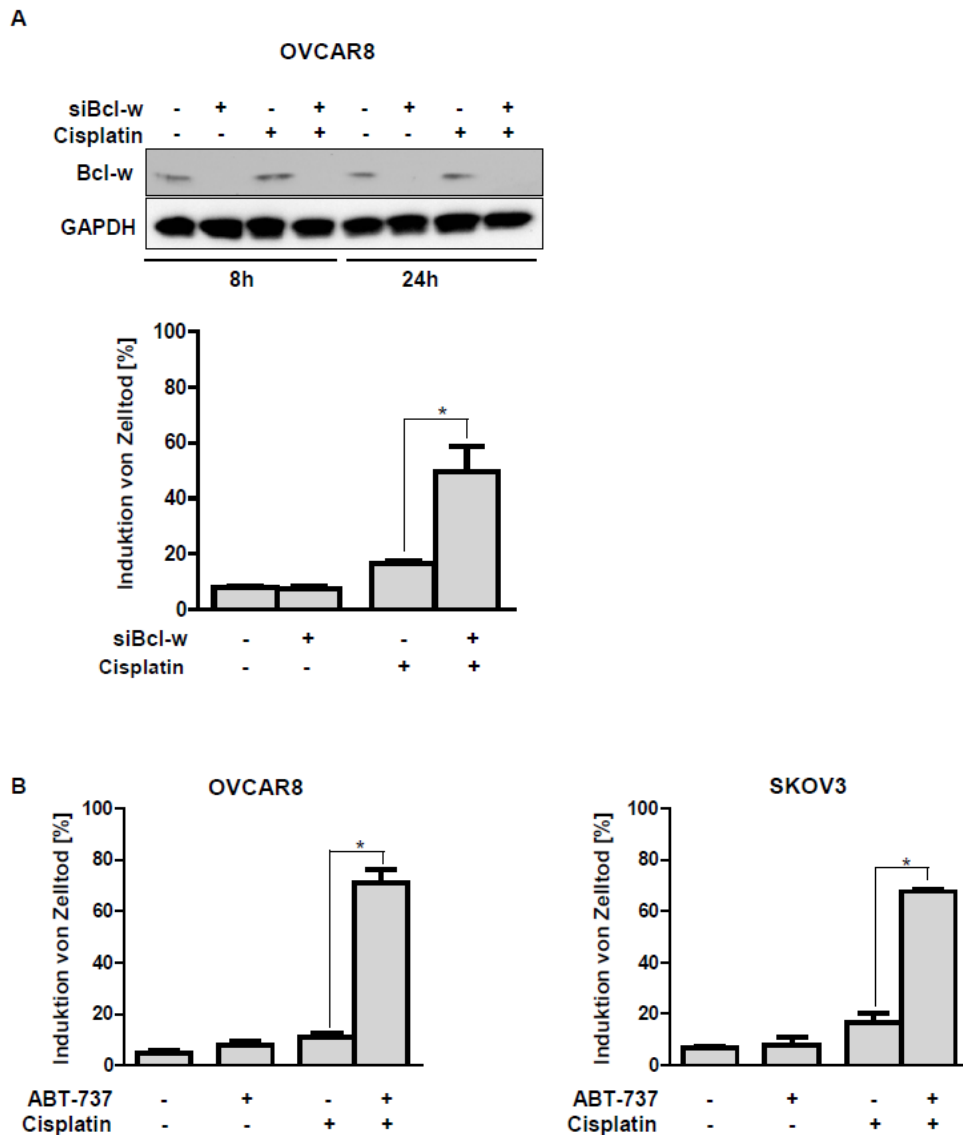


- Abb. 3.29: Die Legende wurde korrigiert.



**Abbildung 3.29:** Die durch Bortezomib induzierte Akkumulation von NOXA führt zu einer NOXA-abhängigen Induktion von Apoptose. OVCAR8-Zellen wurden 2 h vor Inkubation mit und ohne Cisplatin mit und ohne Bortezomib vorinkubiert. 1. Zeile: Überprüfung der Effizienzen der Knockdowns mittels Western-Blot-Analyse. 2. Zeile: 24 h nach Inkubation mit und ohne Cisplatin wurden die Zellen mit AnnexinV-FITC/PI-Färbung gefärbt und der Zelltod im Durchflusszytometer gemessen. Jeder Balken repräsentiert das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$ SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweiseitigem, gepaartem t-Test berechnet und p-Werte  $< 0,05$  mittels (\*) gekennzeichnet.

- Abb. 3.30: Der GAPDH Western Blot sowie die Legende wurden korrigiert.



**Abbildung 3.30:** Sowohl der Knockdown, als auch die pharmakologische Modulation von Bcl-w führt zu einer signifikanten Induktion von Apoptose in nicht Cisplatin-sensitiven Zellen. (A) Knockdown von Bcl-w in der Cisplatin-insensitiven Zelllinie OVCAR8. 1. Zeile: Überprüfung der Effizienz der Knockdowns mittels Western-Blot-Analyse. 2. Zeile: 48 h nach Inkubation mit und ohne Cisplatin wurden die Zellen mit AnnexinV-FITC/PI-Färbung gefärbt und der Zelltod im Durchflusszytometer gemessen. Jeder Balken repräsentiert das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$ SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweiseitigem, gepaartem t-Test berechnet und p-Werte  $<0,05$  mit (\*) gekennzeichnet. (B) 2 h vor Inkubation mit und ohne Cisplatin erfolgte die Vorinkubation mit ABT-737. 48 h nach Inkubation mit und ohne Cisplatin wurden die Zellen mit AnnexinV-FITC/PI-Färbung gefärbt und der Zelltod im Durchflusszytometer gemessen. Jeder Balken repräsentiert das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$ SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels zweiseitigem, gepaartem t-Test berechnet und p-Werte  $<0,05$  mit (\*) gekennzeichnet.