

Aus dem Institut für Toxikologie der Universitätsmedizin der  
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Der Einfluss der Expression der Histondeacetylase 2 auf die humane kolorektale  
Karzinomzelllinie RKO

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Helena Regina Schwarz  
aus Oberwesel

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

[REDACTED]

1. Gutachter:

[REDACTED]

2. Gutachter:

[REDACTED]

Tag der Promotion:

07. Dezember 2021

*Unsere größte Schwäche liegt im Aufgeben.  
Der sicherste Weg zum Erfolg ist immer,  
es doch noch einmal zu versuchen.*

Thomas Alva Edison, US-amerikanischer Erfinder (1847-1931)

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	- 1 -
2	Literaturdiskussion .....	- 3 -
2.1	Kolorektales Karzinom .....	- 3 -
2.1.1	Entstehung des kolorektalen Karzinoms .....	- 4 -
2.1.2	Tumorheterogenität .....	- 8 -
2.1.3	Klassifikation und Staging .....	- 10 -
2.1.4	Therapie .....	- 11 -
2.2	Lynch Syndrom und die Zelllinie RKO .....	- 16 -
2.2.1	Lynch Syndrom .....	- 16 -
2.2.2	Humane Karzinomzelllinie RKO .....	- 17 -
2.3	Histondeacetylasen .....	- 18 -
2.3.1	Rolle von HDAC2 in Karzinomen .....	- 19 -
2.3.2	Inhibitoren von Histondeacetylasen .....	- 20 -
3	Material und Methoden .....	- 22 -
3.1	Material .....	- 22 -
3.1.1	Geräte und Verbrauchsmittel .....	- 22 -
3.1.2	Spezielle Chemikalien und Verbrauchsmittel .....	- 23 -
3.1.3	Puffer- und Stammlösungen .....	- 23 -
3.1.4	Antikörper .....	- 25 -
3.1.5	Inhibitoren .....	- 26 -
3.1.6	Zelllinien .....	- 26 -
3.1.7	Software .....	- 27 -
3.2	Methoden .....	- 28 -
3.2.1	Zellkultur .....	- 28 -
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden .....	- 30 -
3.2.3	Behandlung mit Inhibitoren .....	- 32 -
3.2.4	Analysen mittels Durchflusszytometrie .....	- 33 -
3.2.5	Statistische Auswertung .....	- 35 -

4	Ergebnisse .....	- 36 -
4.1	Untersuchung der Expression von HDAC2 in RKO-ATCC .....	- 36 -
4.2	Etablierung und Charakterisierung der verschiedenen RKO Zelllinien .....	- 38 -
4.2.1	Etablierung neuer Zelllinien durch Grenzzellverdünnung und Einzelzellselektion der RKO-ATCC Zelllinie .....	- 38 -
4.2.2	Charakterisierung der HDAC2 Proteinexpression in RKO Zelllinien .....	- 39 -
4.2.3	Wachstumsverhalten und Morphologie der Zelllinien .....	- 41 -
4.3	<i>In vitro</i> Ansprechen der RKO Zelllinien auf unterschiedliche medikamentöse Behandlungen .....	- 45 -
4.3.1	Dosisfindung des Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil in RKO-ES und RKO-ATCC Zellen .....	- 45 -
4.3.2	Sensitivität der RKO Zelllinien für die Behandlung mit 5-FU.....	- 48 -
4.3.3	Sensitivität der RKO Zelllinien für die Behandlung mit Oxaliplatin .....	- 52 -
4.3.4	Effekt von HDAC Inhibitoren in den RKO Zelllinien .....	- 56 -
4.4	Induktion veränderter HDAC2 Expression innerhalb der RKO-ATCC Zelllinie.....	- 58 -
5	Diskussion.....	- 61 -
5.1	Intratumorale Heterogenität durch HDAC2.....	- 62 -
5.2	Etablierung RKO Zelllinien mit unterschiedlichen HDAC2 Expression .....	- 63 -
5.2.1	HDAC2 Status ohne Einfluss auf Expression anderer Klasse 1 HDACs .....	- 64 -
5.2.2	Verlust von HDAC2 unabhängig von Epithelial-Mesenchymaler Transition.....	- 64 -
5.3	Einfluss der HDAC2 Expression auf die Chemosensitivität .....	- 66 -
5.3.1	HDAC2 Verlust verringert <i>in vitro</i> Wirksamkeit von 5-Fluorouracil.....	- 66 -
5.3.2	HDAC2-Verlust verringert <i>in vitro</i> Wirksamkeit von Oxaliplatin.....	- 68 -
5.3.3	Wirksamkeit von HDAC-Inhibitoren unabhängig von HDAC2 Status der RKO Zellen ..	- 70 -
5.4	Langzeitbehandlung mit Chemotherapeutika führen zu veränderter HDAC2 Expression....	- 72 -
6	Zusammenfassung.....	- 74 -
7	Literaturverzeichnis .....	I

8 Anhang.....VI  
8.1 Anhang Abbildungen.....VI  
8.2 Anhang Tabellen.....IX

# Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
5-FU	5-Fluorouracil
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
ACH3	Acetyliertes Histon 3
ACTUB	Acetyliertes Tubulin
ad.	Auffüllen auf
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BRAF	<i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CIMP	<i>CpG island methylator pathway</i>
CIN	chromosomale Instabilität
DACH	1,2-Diaminocyclohexyl
dest.	destilliert
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dTMP	Desoxy-Thymidin-Monophosphat
DTT	1,4-Dithio-L-Threitol
dUMP	Desoxy-Uracil-Monophosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
et al.	und andere
FACS	<i>Fluorescence activates cell sorter</i>
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis coli
FCS	Fötale Kälberserum
FSC	<i>forward scatter channel</i>
h	Stunde
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylasen-Inhibitor
HEPES	Hydroxyethylpiperazin - Ethansulfonsäure Puffer
hMLH1	<i>Human MutL Homolog 1</i>
HNPCC	<i>Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer</i>
HSP90	<i>heat shock protein 90</i>
IGFBP7	<i>insulin like growth factor binding protein 7</i>
kDa	Kilodalton
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene</i>
KRK	kolorektales Karzinom
LEF-1	<i>lymphoid enhancing factor-1</i>
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
LZ	Langzeitbehandlung
M	molar (mol/ L)
mL	Milliliter
MMR	<i>mismatch repair</i>
MSH2	MutS homolog 2
MSH6	MutS homolog 6
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H	Mikrosatelliteninstabilität hohes Level

MSI-L	Mikrosatelliteninstabilität niedriges Level
MSS	Mikrosatellitenstabilität
NER	<i>nucleotide excision repair</i>
NF1C	<i>nuclear factor 1 C</i>
nM	nanomolar
NRF2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor</i>
ns	nicht signifikant
p	Signifikanz
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PI	Propidiumiodid
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PMS2	<i>postmeiotic segregation increased 2</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute [1/min]
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSA/P	sessil serratiertes Adenom / Polyp
SSC	<i>side scatter channel</i>
STR	<i>short tandem repeat</i>
Tbl.	Tablette
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung + 0,05 % Tween
TCF-1	<i>t-cell factor-1</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
Tris	Tris- (hydroxymethyl-) aminomethan
TS	Thymidylatsynthase
TSA	Trichostatin A
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
OX	Oxaliplatin
v. a.	vor allem
w/v	Gewicht pro Volumen
Well	Loch/ Vertiefung in Zellkulturplatte
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil



# Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

## Tabellen:

Tabelle 1 Geräte und Verbrauchsmittel.....	- 22 -
Tabelle 2 Spezielle Chemikalien und Verbrauchsmittel.....	- 23 -
Tabelle 3 Puffer- und Stammlösung.....	- 24 -
Tabelle 4 Primärantikörper.....	- 25 -
Tabelle 5 Sekundäre Detektionsantikörper.....	- 25 -
Tabelle 6 Inhibitoren.....	- 26 -
Tabelle 7 Verwendete Zelllinien.....	- 26 -
Tabelle 8 Software.....	- 27 -

## Abbildungen:

Abbildung 1 Molekulare Subtypen des kolorektalen Karzinoms (modifiziert nach Pox et al [15]).....	- 5 -
Abbildung 2 Modell der Tumorentstehung des kolorektalen Karzinoms (modifiziert nach Dekker et al. [24]).....	- 6 -
Abbildung 3 Tumorheterogenität.....	- 9 -
Abbildung 4 Wirkungsweise von 5-Fluorouracil (modifiziert nach Liu et al. [44]).....	- 12 -
Abbildung 5 Wirkungsweise von Oxaliplatin [50].....	- 14 -
Abbildung 6 Ablauf der Selektion der Einzelzellklone.....	- 29 -
Abbildung 7 Behandlungsschema Langzeitversuche.....	- 33 -
Abbildung 8 Histogramm der Zellzyklusanalyse.....	- 34 -
Abbildung 9 Immunfluoreszenz von HDAC2 in der RKO-ATCC Zelllinie.....	- 36 -
Abbildung 10 Immunfluoreszenz von HDAC1 in der RKO-ATCC Zelllinie.....	- 37 -
Abbildung 11 Bestimmung des HDAC2 Status der Einzelzellklone.....	- 38 -
Abbildung 12 Proteinexpression verschiedener HDACs.....	- 39 -
Abbildung 13 Immunfluoreszenz von HDAC2 in den Zelllinien RKO HDAC2 positiv und RKO HDAC2 negativ.....	- 40 -
Abbildung 14 Zellzyklus unbehandelter Zellen.....	- 42 -
Abbildung 15 Hellfeldmikroskopische Darstellung der verschiedenen RKO Zelllinien..	- 43 -
Abbildung 16 Behandlung der RKO-ES und RKO-ATCC Zellen mit 5-FU zur Dosisfindung . .....	- 46 -
Abbildung 17 Durch Komplexbindung mit 5-FU inhibierter TS-Anteil.....	- 47 -
Abbildung 18 Die Behandlung von RKO Zellen mit 5 µM 5-FU induziert signifikant unterschiedlich den Zelltod.....	- 48 -

Abbildung 19 Zelltodanalyse mittels Durchflusszytometrie der RKO Zellen nach Behandlung mit 5-FU .....	- 50 -
Abbildung 20 Die Behandlung von RKO Zellen mit 10 $\mu$ M Oxaliplatin induziert den Zelltod.. .....	- 52 -
Abbildung 21 Zelltodanalyse mittels Durchflusszytometrie nach Behandlung mit Oxaliplatin .....	- 54 -
Abbildung 22 Behandlung mit den HDACi MS-275 und LBH-589.....	- 56 -
Abbildung 23 Die Langzeitbehandlung (LZ) von RKO-ATCC Zellen mit 5-FU und OX verändert die HDAC2 Expression .....	- 59 -

# 1 Einleitung

In der modernen Medizin gibt es stetig neue Therapieoptionen für die verschiedensten Erkrankungen. Oft basieren diese Therapien auf neuem Wissen über molekulare Strukturen oder Stoffwechselprozessen der entsprechenden Krankheiten. Dementsprechend kann jedes neue Detail über eine Krankheit wichtige Informationen auf dem Weg zu einer verbesserten Therapie liefern. Durch die hohe Anzahl an Betroffenen stehen insbesondere maligne Erkrankungen im Mittelpunkt wissenschaftlicher Untersuchungen.

Daraus ergibt sich, dass maligne Tumore im klinischen Alltag und in wissenschaftlichen Fragestellungen immer weiter klassifiziert werden. Klassifiziert wird beispielsweise das Vorhandensein oder Fehlen verschiedener Rezeptoren, genetische Mutationen oder die Expression verschiedener Proteine. Diese sogenannten Biomarker liefern wichtige Erkenntnisse zur Entstehung der verschiedenen Tumorentitäten und ermöglichen klinisch immer genauere prognostische Aussagen und individuellere Therapiekonzepte für die Patienten [1].

Zusätzlich haben einige Studien gezeigt, dass einzelne Tumore nicht als homogenes Gewebe angesehen werden dürfen. Innerhalb eines Tumors kann es parallel Zellen geben, die unterschiedliche Rezeptoren exprimieren, unterschiedliche Mutationen tragen oder sich in anderen Merkmalen von ihren Nachbarzellen unterscheiden. Tumorgewebe sollte also vielmehr als heterogener Zellverband mit verschiedenen Subklonen angesehen werden [2]. Insbesondere die Heterogenität von Kolorektalen Karzinomen (KRK) konnte in Studien aufgezeigt werden. Es wurden Subklone innerhalb eines Tumors identifiziert, die sich in der Expression verschiedener Proteinkinasen wie etwa PIK3CA von der Mehrheit der übrigen Tumorzellen unterscheiden. Es gibt Hinweise, dass diese Subklone eine bedeutende Rolle im Therapieansprechen und v. a. sekundärer Therapieresistenz spielen könnten [3-5]. Beispielsweise wird sekundäre Resistenzentwicklung, trotz des hohen initialen Therapieansprechens, von Imatinib bei der chronisch-myeloischen Leukämie am ehesten auf solche heterogenen Subklone zurückgeführt [6, 7].

Neben vielen weiteren Ansätzen rückt die Enzymgruppe der Histondeacetylasen (HDACs) immer weiter in den Fokus der Forschung. HDACs und ihre Gegenspieler, die Histonacetyltransferasen (HATs), regulieren, entgegen ihres Namens, jedoch nicht nur die Acetylierung von Histonen sondern auch einer Vielzahl weiterer Proteine. Diese epigenetische Modifikation von Histonen und nicht-Histon Proteinen nimmt Einfluss auf die Aktivität der modifizierten Proteine und damit auf unterschiedlichste intrazelluläre Prozesse. Dadurch haben HDACs und HATs eine bedeutende Rolle in physiologischen Vorgängen, aber auch in der Entstehung und auf den Verlauf verschiedener Krankheiten wie z.B. Immunstörungen, Krebs oder Muskeldystrophien [8].

Insbesondere die Klasse 1 Histondeacetylase HDAC2 reguliert einige wichtige Proteine des Zellwachstums, des Zellzyklusarrests und des Zelltods. In neoplastischen Zellen verschiedener

Entitäten wurde eine im Vergleich zum Normalgewebe veränderte Expression von HDAC2 gefunden. Dies weist auf eine Rolle von HDAC2 in der Tumorentstehung hin [9].

Die unterschiedliche Expression in verschiedenen Tumorentitäten deutet an, dass die Expression von HDAC2 Einfluss auf das Verhalten des Tumors und auch auf sein Therapieansprechen haben könnte.

Ziel dieser Arbeit ist es den Einfluss von HDAC2 *in vitro* in der humane Dickdarmkrebszelllinie RKO zu untersuchen. Die konkreten wissenschaftlichen Fragestellungen, die unter Zuhilfenahme experimenteller *in vitro* Untersuchungen zur Klärung dieses zentralen Zieles beantwortet werden sollen, sind die folgende:

Gibt es in der RKO Zelllinie verschiedene Subpopulationen oder einzelne heterogene Zellen mit einem differentem Expressionslevel an HDAC2?

Wird dieses heterogene Expressionsmuster durch äußere Faktoren beeinflusst?

Hat die Expression von HDAC2 einen Einfluss auf das Therapieansprechen der Tumorzellen auf die Standardchemotherapeutika 5-Fluorouracil (5-FU) und Oxaliplatin (OX)?

Unterscheiden sich die Zellen mit unterschiedlichem HDAC2 Status zusätzlich in der Expression anderer Proteine oder den Wachstums- und Kultureigenschaften?

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Kolorektales Karzinom

Als KRK werden die beiden Tumorentitäten Kolonkarzinom und Rektumkarzinom zusammengefasst. Das Kolonkarzinom betrifft den Dickdarm und das Rektumkarzinom den Mastdarm. Folglich unterscheiden sich die beiden Malignome in ihrer Lokalisation. Hinsichtlich Tumorentstehung, Vorläuferzellen und genetischen Mutationen ist die Differenzierung der beiden Tumoren jedoch nur begrenzt sinnvoll. Histologisch ist es nicht sicher möglich Kolonkarzinome von Rektumkarzinomen zu unterscheiden [10, 11].

Das KRK war laut Weltgesundheitsorganisation WHO im Jahr 2018 Ursache für weltweit fast 862.000 Todesfällen. Damit steht das KRK global an zweiter Stelle der krebsbedingten Todesfälle [12]. In Deutschland gibt es ein Lebenszeitrisiko von circa 5 % (Frauen 4,9 %, Männer 6,0 %) an Dickdarm- oder Mastdarmkrebs zu erkranken. Damit ist etwa jeder 20. Einwohner der Bundesrepublik Deutschland im Laufe seines Lebens mit der Diagnose Dickdarm bzw. Enddarmkrebs konfrontiert. Das Erkrankungsrisiko steigt dabei stetig mit dem Lebensalter an [13]. Durchschnittlich wird die Diagnose bei einem medianen Erkrankungsalter von leicht über 70 Jahren gestellt, wobei Männer bei Diagnosestellung im Schnitt etwas jünger sind als Frauen [14].

Geographisch betrachtet ist die Erkrankungswahrscheinlichkeit des KRK ungleichmäßig verteilt. Eine hohe Inzidenz herrscht in Industrienationen z. B. in Europa oder Nordamerika. Menschen in Afrika oder Asien haben hingegen ein deutlich niedrigeres Risiko. Diese Unterschiede resultieren überwiegend aus unterschiedlicher Ernährung und unterschiedlichem Lebensstil. Der sogenannte *Western Lifestyle* mit fettreicher, ballaststoffarmer Ernährung, viel rotem Fleisch und wenig Bewegung fördert die Entstehung des KRK. Faserreiche, fleischarme Ernährung mit viel Gemüse und Fisch, wie sie in Afrika, Asien oder Teilen von Europa (z. B. Mittelmeerraum) vorkommt, reduziert hingegen das Erkrankungsrisiko [14, 15].

Diese Unterschiede gleichen sich jedoch in den letzten Jahren immer weiter an. Während die Inzidenz in Hochrisiko-Ländern seit Jahrzehnten stabil bleibt bzw. in den letzten Jahren leicht sinkt, steigt die Zahl der Neuerkrankungen in Ländern mit bisher niedrigem Risiko immer weiter an [16]. Als Ursache für den Anstieg wird hierbei die Ausbreitung des westlichen Lebensstils auf Länder mit traditionell niedrigeren Raten an KRK angesehen. Grund für die stabilen Inzidenzraten einiger Länder sind vor allem Vorsorgeprogramme, wie die empfohlene Koloskopie oder die Testung auf okkultes Blut im Stuhl. Zusätzlich scheinen die Inzidenzraten der Karzinome durch eine Chemoprävention, also die dauerhafte Einnahme eines Medikamentes durch gesunde Personen mit erhöhtem Erkrankungsrisiko, positiv beeinflussbar zu sein. In Metaanalysen hat sich dabei vor allem der Einsatz von Aspirin oder Metformin als protektiv erwiesen [16, 17].

Neben den beeinflussbaren Risikofaktoren, die in erster Linie den Lebensstil und die Ernährung betreffen, gibt es weitere nicht beeinflussbare Risikofaktoren. So ist das Risiko an einem KRK zu erkranken z.B. bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn, deutlich erhöht. Auch familiäre Tumorsyndrome, die auf genetischen Mutationen von Tumorsuppressor- oder Onkogenen beruhen, wie Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP) oder Hereditärer Nicht-Polypöser Darmkrebs (HNPCC) erhöhen die Erkrankungswahrscheinlichkeit drastisch. Personen mit FAP erkranken zu fast 100% im Laufe ihres Lebens an einem KRK [18].

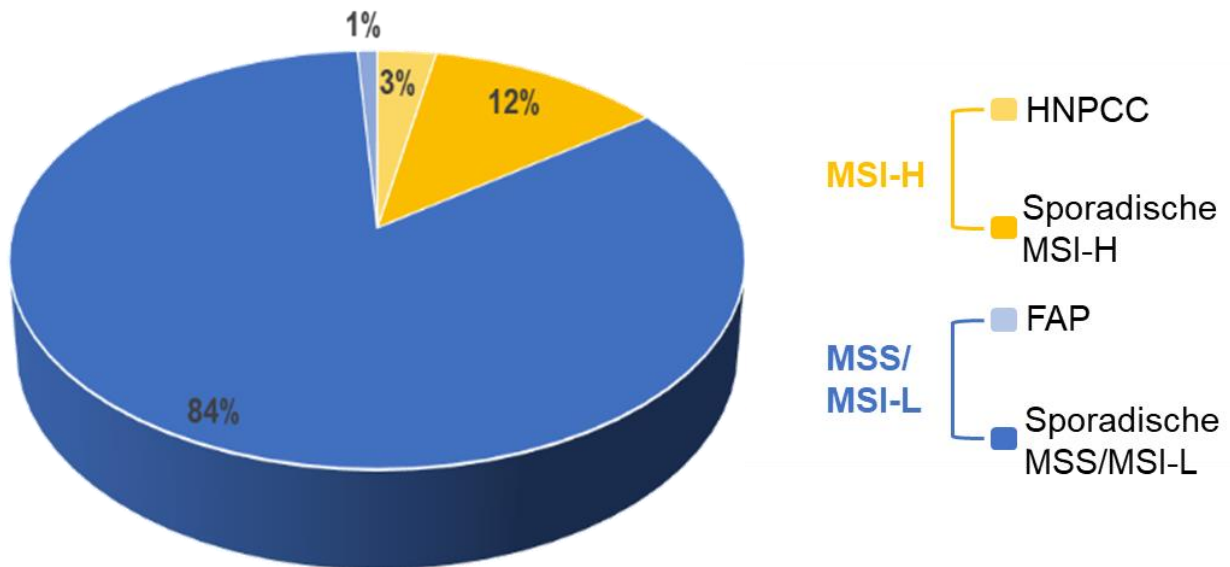
Dank neuer Therapiemöglichkeiten und verbesserter Vorsorgeprogrammen konnte die Mortalität in den letzten Jahrzehnten gesenkt werden. Allerdings ist das 5-Jahres-Überleben mit durchschnittlich circa 62,5 % im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen immer noch niedrig. Die Überlebenschance hängt dabei in erster Linie vom Stadium der Erkrankung bei Erstdiagnose ab. Wird das Malignom frühzeitig erkannt und ist lokal begrenzt, besteht eine 5-Jahres-Überlebenschance von ungefähr 90 %. Für weit fortgeschrittene, fernmetastasierte Tumore reduziert sich die Prognose deutlich. Statistisch überleben in diesem Fall nur etwa 13 % die ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung [15].

Das KRK stellt damit eine häufige und immer noch in vielen Fällen tödliche Erkrankung dar.

### 2.1.1 Entstehung des kolorektalen Karzinoms

Lange Zeit hat man das KRK als eine einheitliche Tumorentität angesehen, deren Tumorentstehung entsprechend einem früh entdeckten Mechanismus abläuft. Dieser klassische Entstehungsweg wird Adenom-Karzinom-Sequenz genannt und beschreibt die Entwicklung des malignen Tumors aus Adenomen als Präkanzerose [19]. Für diese Entwicklung aus normaler Schleimhaut über Adenome bis hin zum Karzinom kennt man einige verantwortliche Mutationen [20].

Heute weiß man jedoch, dass KRK multifaktoriell entstehen können und es sich folglich um eine inhomogene Gruppe von Tumoren handelt (Abb. 1).



**Abbildung 1 Molekulare Subtypen des kolorektalen Karzinoms (modifiziert nach Pox et al [15])**

85 % des KRKs sind MSS oder MSI-L (Blautöne), davon sind 84 % sporadisch entstandene Tumore und 1% Tumore bei FAP. Gelb dargestellt sind die MSI-H Tumore mit insgesamt 15 %. 12 % sporadisch entstanden und 3 % im Rahmen von HNPCC.

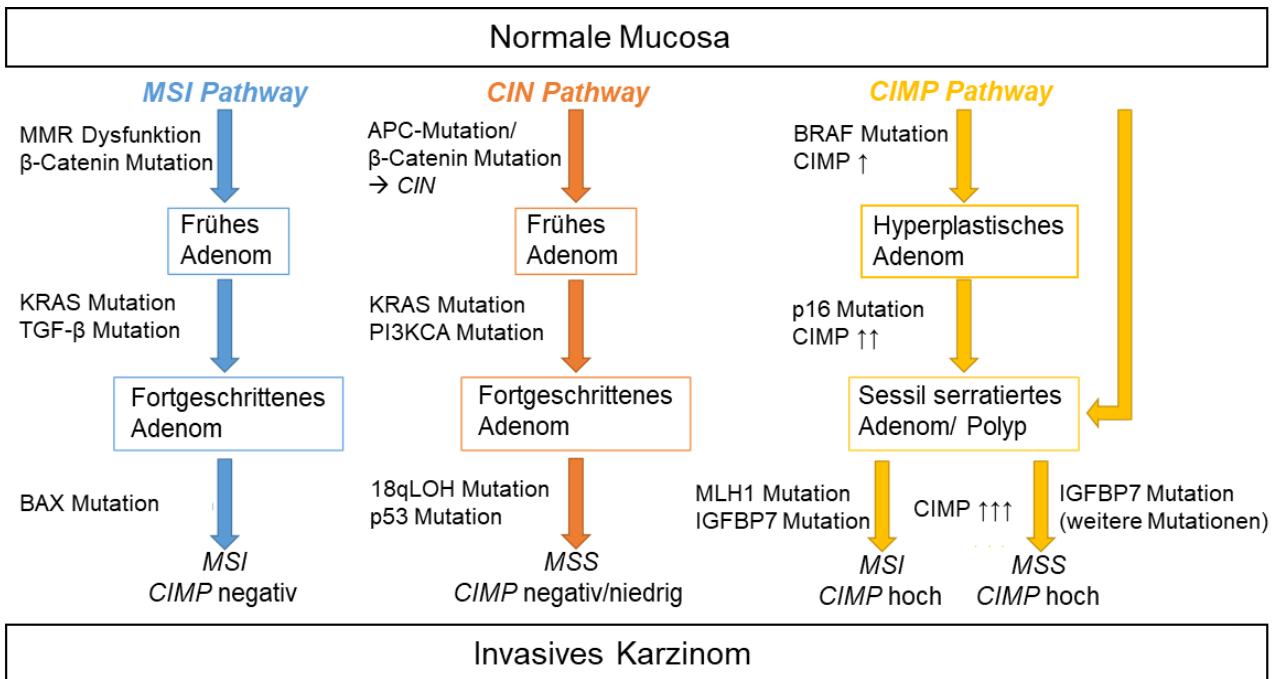
Auf molekularer Ebene ist die Unterscheidung zwischen mikrosatellitenstabilen (MSS) und mikrosatelliteninstabilen (MSI) KRK bedeutend. Als Mikrosatelliten werden kurze, sich wiederholende Sequenzen von Basenpaaren in der DNA bezeichnet. Die Anzahl dieser Wiederholungen ist dabei charakteristisch für einzelne DNA-Abschnitte sowie individuell für jede Person. Diese Sequenzen sind 1-6 Basenpaare lang und werden daher auch als *short tandem repeats* (STR) bezeichnet. Die Wiederholung der Basenabfolge macht diese Mikrosatelliten anfällig für Fehler in der Replikation. Durch anschließend fehlerhafte Reparatur dieser Abschnitte kann sich die Anzahl der Wiederholungen verändern, was als Mikrosatelliteninstabilität bezeichnet wird. Mikrosatelliteninstabilität ist dabei nicht nur bedeutend für die Entstehung von Karzinomen, sie kann auch aus therapeutischer und prognostischer Sicht für Patienten entscheidend sein [21, 22].

Neben der Kenntnis über potenzielle Veränderungen der Mikrosatelliten ist es auch wichtig zu wissen, ob das KRK sporadisch auftritt oder im Zusammenhang zu familiären Tumorsyndromen steht. Über 90 % der KRK treten sporadisch auf und ist überwiegend MSS (Abb. 1). Prozentual gesehen sind familiäre Tumore mit weniger als 10 % selten und die Mikrosatellitenstabilität dieser Tumore variiert stark (Abb. 1).

Jedoch lässt die prozentuale Verteilung der Tumore des Kolons/ bzw. Rektums keine Rückschlüsse bezüglich weiterer Mutationen, Vorläuferläsionen oder Ätiologie zu. Es ist also wichtig die Entstehung der KRK genauer zu betrachten, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede der verschiedenen Tumore besser zu verstehen [15, 23].

Man muss drei Entstehungswege voneinander differenzieren, die alle auf genetischer Instabilität beruhen (Abb. 2).

Es gibt allerdings daneben immer wieder Tumore, die sich nicht eindeutig einem dieser Entstehungswege zuteilen lassen, was vermuten lässt, dass es Überschneidungen der verschiedenen Entstehungskaskaden geben muss [24].



**Abbildung 2 Modell der Tumorentstehung des kolorektalen Karzinoms (modifiziert nach Dekker et al. [24])**

Die Abbildung zeigt drei verschiedene Wege mit wichtigen Schlüsselmutationen in der Entstehung des KRKs. Blau dargestellt ist der MSI Pathway, rot zeigt den CIN Pathway und gelb den CIMP Pathway.

Gemeinsam ist den drei Wegen, dass die Entstehung des invasiven Karzinoms über benigne, aber potenziell präkanzeröse Vorstufen verläuft. Sowohl bei MSI sowie bei Tumoren mit chromosomaler Instabilität (CIN) entwickelt sich das Malignom aus den klassischen Adenomen. Bereits anhand der Vorläuferläsion kann man daher den CpG island methylation phenotype (CIMP) Pathway von den anderen beiden unterscheiden. Hier sind die Vorstufen keine klassischen Adenome, sondern serratierte Neoplasien. Die direkten Präkanzerosen stellen dabei das sessil serratierte Adenom oder der sessil serratierte Polyp (SSA/P) dar, aus denen sich das Karzinom entwickelt. SSA/P kann dabei direkt aus gesunder Schleimhaut oder über die Zwischenstufe eines hyperplastischen Adenoms entstehen [24].

Mit circa 70 % entstehen die meisten aller KRK über den CIN Pathway, der erstmals im Rahmen der FAP Tumore beschrieben wurde. Die CIN beruht nach aktuellem Stand der Wissenschaft auf fehlerhaften Vorgängen während der Mitosephase der Zellteilung. Jedoch sind weder die exakte Ursache noch die Rolle verschiedener Checkpoint Regulatoren der Mitose genau bekannt. Die Auswirkungen der CIN sind hingegen besser erforscht. Letztlich folgt aus dieser Instabilität der Verlust der Heterozygotie bestimmter Gene und fördert so die Entstehung weiterer Mutationen [24, 25].



Initialer Schritt des *CIN Pathways* ist die Inaktivierung des APC Gens, was in der Folge zur Akkumulation von  $\beta$ -Catenin führt. Direkte hyperaktivierende (*gain-of-function*) Mutation von  $\beta$ -Catenin können auch auftreten. Die Mutation des APC-Gens tritt dabei sporadisch oder im Rahmen des erblichen Tumorsyndroms FAP auf. Konsequenz beider Mutationen ist die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin sowie die Stimulation weiterer Faktoren wie TCF-1 oder LEF-1 [24, 25]. Daraus resultiert eine verstärkte Proliferation der Kolon- bzw. Rektum-Schleimhaut. Diese erhöhte Proliferation führt in der Folge zur Entstehung der frühen Adenome. Weitere Mutationen in den Signalkaskaden für Zellwachstum oder Apoptose, wie KRAS oder PI3KCA, verstärken die Entwicklung der Adenome und vergrößern dabei das Potential der malignen Entartung. Als Schlüsselmutation von den gutartigen Adenomen zum malignen Karzinom ist der Funktionsverlust des Tumorsuppressors p53 anzusehen. Häufig gibt es parallel zur p53-Mutation in KRK eine Mutation im Chromosom 18. Diese führt zum Verlust der Heterozygotie von Chromosom 18q, auf dem die Information für viele Regulationsgene von Zellproliferation und Zelltod kodiert sind [24]. Man findet die 18qLOH Mutation in circa 70 % aller Adenokarzinome der kolorektalen Schleimhaut [19].

Zweithäufigste Signalkaskade als Ursache von circa 15 % aller KRK ist der *MSI Pathway*. Ausgangspunkt dabei ist die Mikrosatelliteninstabilität bedingt durch eine Dysfunktion des Mismatch Repair (MMR) Systems. Diese kann durch Mutation eines MMR Gens entstehen. Mit 80 % ist dies hauptsächlich die sporadische Hypermethylierung des Promotors des MMR Gens hMLH1. In circa 20 % hingegen sind es erblich bedingte Mutationen im Rahmen des HNPCC z. B. in MMR Genen MSH2 und MSH 6 [22, 24, 26]. Resultat der MSI ist eine erhöhte Mutationsrate in den kolorektalen Zellen, die die Tumorentstehung erleichtert.

Analog zum *CIN Pathway* ist  $\beta$ -Catenin auch im *MSI Pathway* häufig früh mutiert, was zur Entstehung von Adenomen als gemeinsame Vorläufermutation beider Signalkaskaden führt. Das Wachstum dieser Adenome wird im *MSI Pathway* durch weitere Mutationen wie KRAS oder TGF- $\beta$  verstärkt [22, 24]. Die Mutation von TGF- $\beta$ , einem Inhibitor des epithelialen Zellwachstums, ist dabei charakteristisch für erbliche HNPCC Tumore und in über 80 % der HNPCC assoziierten Karzinome zu finden [24, 27].

Der Übergang vom Adenom zum Karzinom unterscheidet sich trotz makroskopisch gemeinsamer Vorläuferläsion zwischen *CIN* und *MSI Pathway*. In der *MSI* Signalkaskade ist die Inaktivierung des BAX Gens meist für die maligne Entartung verantwortlich und P53 ist nur in wenigen Tumoren mutiert. Physiologisch wird BAX durch P53 aktiviert und leitet die Apoptose ein. Entsprechend verhindert die Mutation im BAX Gen den apoptotischen Zelluntergang und erleichtert so die maligne Entartung [24, 28].

Der dritte Weg zum KRK verläuft über verschiedene serratierte Neoplasien. Basis des *CIMP Pathways* ist die Hypermethylierung verschiedener Promotorregionen, die zur Stilllegung der entsprechenden Gene führen [29]. Analog zur KRAS Mutation der klassischen Adenome führt die

Mutation des Protoonkogens BRAF zur unkontrollierten Zellproliferation und so zur Entstehung hyperplastischer oder sessil serratierter Adenome [30]. Für den Progress von hyperplastischen Adenomen zu SSA/Ps sind weitere Mutationen notwendig. Häufig ist dabei der Tumorsuppressor P16 dysfunktional mutiert. Hierdurch entfällt die Kontrollfunktion von P16 im Zellzyklus, was die Proliferation weiter verstärkt. Für die Entartung zum Malignom ist im *CIMP Pathway* die Mutation des IGFBP7 Gens entscheidend. Der mutierte Tumorsuppressor IGFBP7 kann weder P53 aktivieren noch die Apoptose einleiten, dies verstärkt die unkontrollierte Proliferation weiter und initiiert die Entwicklung des Karzinoms aus den Vorläuferläsionen. Der Mikrosatellitenstatus dieser Tumore ist unterschiedlich und abhängig von einer potenziellen Mutation von hMLH1 [24, 31].

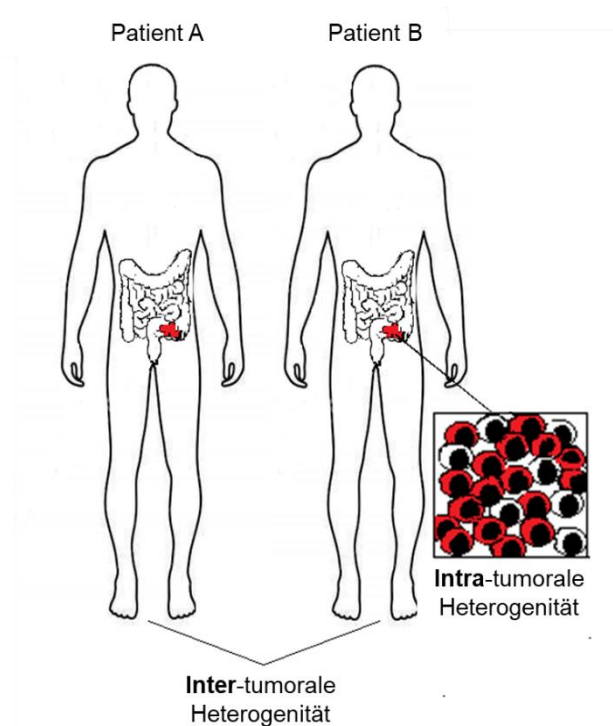
Die hier dargestellte Tumorgenese ist bei kolorektalen Tumoren insgesamt ein langsamer Prozess über mehrere Jahre. Allerdings ist zu beachten, dass sich die verschiedenen Entstehungswege auch in ihrer Geschwindigkeit voneinander unterscheiden. Die klassischen CIN Tumore entwickeln sich über eine geschätzte Dauer von bis zu 15 Jahren am langsamsten [32]. MSI Tumore von HNPCC entstehen durchschnittlich innerhalb von drei bis fünf Jahren und damit deutlich schneller [33].

Insgesamt betrachtet entartet nur eine geringe Anzahl der Vorläuferläsionen tatsächlich maligne. Jedoch muss dabei immer bedacht werden, dass die verschiedenen Läsionen ein sehr unterschiedliches Potential aufweisen in ein Karzinom überzugehen. Entsprechende Konsequenzen müssen hinsichtlich Vorsorgeuntersuchungen, Verlaufskontrollen oder Behandlung bei bekannten Vorläuferläsionen gezogen werden [24].

### 2.1.2 Tumorheterogenität

Die verschiedenen Entstehungswege des KRK zeigen bereits, dass makroskopisch identisch erscheinende Karzinome gleicher Entität auf molekulare Ebene nicht als identische Tumormasse angesehen werden sollten. Diese Erkenntnis, die in den letzten Jahren und Jahrzehnten nicht nur das Verständnis von Malignomen, sondern auch ihre Therapie grundlegend verändert hat, nennt man Tumorheterogenität. Diese Heterogenität kann nach verschiedenen Gesichtspunkten weiter charakterisiert werden.

Unter inter-tumorale Heterogenität versteht man molekulare Unterschiede auf Zellebene von Tumoren gleicher Entität in unterschiedlichen Patienten. Intra-tumorale Heterogenität meint hingegen Zellunterschiede innerhalb eines Patienten. Diese Unterschiede können sich entweder lokal, innerhalb einer makroskopisch zusammengehörigen Tumormasse zeigen (Abb. 3), oder als örtlich getrennte Tumormanifestation eines Ursprungstumors, im Sinne der Metastasenbildung.



**Abbildung 3 Tumorerogenität**

Vereinfachte Darstellung von inter- und intra-tumoraler Heterogenität. Makroskopische Darstellung des kolorektalen Karzinoms (rot) der beiden Patienten A und B als Beispiel von inter-tumoraler Heterogenität. In der Vergrößerung erkennbare intra-tumorale Heterogenität durch unterschiedliche Zellen (weiß und rot) innerhalb desselben Tumorverbandes.

Diese molekulare Heterogenität kann verschiedene Ursachen haben, sie kann genetisch, epigenetisch oder lediglich phänotypisch bedingt sein [34]. Wie genau diese Heterogenität entsteht, ist bis dato nicht endgültig geklärt. Es gibt zahlreiche Hypothesen und einige bekannte Faktoren, die die Entstehung und Ausprägung unterschiedlicher molekularer Eigenschaften eines Malignoms bedingen. Bekannte externe Mutagene sind z. B. Zigarettenrauch, UV- oder radioaktive Strahlung. Endogene Faktoren sind bspw. präexistente genetische Defekte, Verluste von DNA-Reparatursystemen oder eine hohe Rate an Spontanmutationen im Rahmen der Tumorgenese [34, 35].

Besonders in soliden Tumoren ist die Spanne der intra-tumoralen Heterogenität und der beteiligten Mutationen sehr groß und hat häufig Einfluss auf die Prognose und das Therapieansprechen [36]. Eine Möglichkeit zur besseren Evaluation der unterschiedlichen molekularen Eigenschaften innerhalb einer Tumormasse scheint die Einzelzellanalyse zu sein. Dabei wird die Tumormasse eben nicht mehr als „Masse“ spezifiziert, sondern vielmehr einzelne Zellen nach ihren Eigenschaften, wie z. B. der in ihnen vorliegenden Proteinexpression, charakterisiert [37]. Durch Erweiterung der Erkenntnisse zu diesen molekular heterogenen Eigenschaften individueller Tumorzellen könnte so langfristig die Ansprechrate von individueller Tumorthherapie weiter erhöht werden.

### 2.1.3 Klassifikation und *Staging*

Klinisch werden fast alle Karzinome nach TNM-Kriterien klassifiziert und anhand dieser in unterschiedliche Stadien eingeteilt. Das *Staging* des KRKs erfolgt nach den Kriterien der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) [38].

Für die TNM-Klassifikation werden histologisch und klinisch analysiert:

T (Tumor)	= Tiefenausbreitung des Primarius
N (Nodus)	= Anzahl von regionären Lymphknotenmetastasen
M (Metastase)	= Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen.

Diese drei Komponenten werden durch exakte Analyse in weitere Untergruppen eingeteilt, um jeden einzelnen Tumor möglichst genau charakterisieren zu können. Bei der Tumorausdehnung wird bspw. histologisch bzw. chirurgisch beurteilt, ob sich der Tumor nur auf bestimmte Gewebeschichten beschränkt oder bereits organübergreifend wächst. So entspricht eine Tumorausdehnung begrenzt auf die Submukosa beim Kolon- oder Rektumkarzinom einem T1 Stadium, während die Infiltration weitere Organe mit einem T4b gleichzusetzen ist. Vergleichbar dazu wird N nach Anzahl der betroffenen Lymphknoten in N0, N1 a-c und N2 a-b und M nach Lokalisation der Fernmetastasen in M0 und M1 a-b eingeteilt.

Die TNM Klassifikation wird auch verwendet, um Tumorprogress oder Tumorregress nach Therapie zu standardisieren.

Mit Hilfe der bekannten TNM Kriterien kann anschließend jeder Tumor einem Stadium nach UICC zugeteilt werden. Die UICC unterscheidet dabei Stadium 0 bis IV, wobei die Stadien II und III jeweils weiter in A, B, C und Stadium IV in A und B unterteilt werden. Tumore des Stadium 0 sind lokal begrenzt und haben damit die beste Prognose. Tumore des Stadium IV sind hingegen immer fernmetastasiert, also M1 und damit prognostisch deutlich schlechter für den Patienten.

Neben der Stadieneinteilung nach UICC wird der Tumor zusätzlich histologisch nach seinem Differenzierungsgrad charakterisiert. Im Rahmen dieses *Gradings* wird die Abweichung des Tumorgewebes von seinem Ursprungsgewebe beurteilt. Gut differenzierte Tumore (G1) sind dabei ihrem Ursprungsgewebe noch sehr ähnlich. Schlecht differenzierte Tumore (G4) können mikroskopisch hingegen kaum noch ihrem ursprünglichen Gewebe zugeordnet werden und zeigen eine deutlich höhere Zellteilungsrate. Mit sinkender Differenzierung erhöht sich der Malignitätsgrad des Tumors und die Prognose verschlechtert sich [39].

Neben der prognostischen Aussagekraft ist die Klassifikation des Tumors ebenfalls für die Therapieentscheidung wichtig. Die Therapieempfehlungen richten sich dabei unter anderem auch nach Tumorstadium und Differenzierungsgrad.

## 2.1.4 Therapie

Für das KRK gibt es abhängig von Tumorstadium und genauer Lokalisation unterschiedliche Behandlungsleitlinien. Grundsätzlich gibt es die Möglichkeiten der chirurgischen Resektion, der medikamentösen Therapie oder der Bestrahlung. Aus diesen Bausteinen wird im Rahmen einer interdisziplinären Konferenz, Tumorboard genannt, das Therapieziel festgelegt und ein genauer Therapieplan für den Patienten erstellt. Dabei muss neben dem *Staging* des Tumors (TNM und UICC Klassifikation) auch die Konstitution des Patienten z. B. hinsichtlich Begleiterkrankungen und Alter beachtet werden. Bei zu weit fortgeschrittenen Tumoren oder sehr schwachen Patienten ohne körperliche Reserven gibt es häufig keine kurativen Therapieziele mehr, die Therapie zielt dementsprechend nicht mehr auf eine vollständige Heilung. Bei zu schlechter Prognose muss man sich häufig gegen eine radikale, nebenwirkungsreiche Therapie entscheiden und rückt stattdessen die verbleibende Lebensqualität des Patienten in den Fokus. Man versucht dann in palliativer Intention die Lebensqualität des Patienten möglichst lange aufrechtzuerhalten und direkte Beschwerden durch den Tumor zu minimieren.

Bei früh entdeckten Tumoren und Patienten mit ausreichenden körperlichen Kapazitäten zielt die Therapie hingegen auf eine vollständige Genesung. Bestandteil der kurativen Therapiepläne ist dabei eine möglichst vollständige Resektion des Karzinoms. Häufig müssen intraoperativ ebenfalls die angrenzenden Strukturen wie Lymphbahnen oder Faszien mitentfernt werden. Abhängig von Größe, Lokalisation und *Grading* des Tumors wird der Operation eine neoadjuvante Therapie vorangestellt [40]. Dabei wird beim Kolonkarzinom eine Chemotherapie oder beim Rektumkarzinom eine kombinierte Radiochemotherapie aus Bestrahlung und medikamentöser Chemotherapie vorgenommen. Ziel der neoadjuvanten Therapie ist es den Tumor vor der Operation zu verkleinern und damit die Operationsbedingungen zu verbessern. Ist die Verkleinerung des Tumors, das sogenannte *Downstaging*, erfolgreich, ist die angestrebte operative R0-Resektion (vollständige Resektion) wahrscheinlicher zu erreichen.

Da Patienten mit primär fortgeschrittenem Tumorstadium UICC III auch nach erfolgreicher Operation ein hohes Rezidivrisiko von bis zu 50 % haben, bekommen diese Patienten im Anschluss an die Operation eine adjuvante Chemotherapie [15, 41].

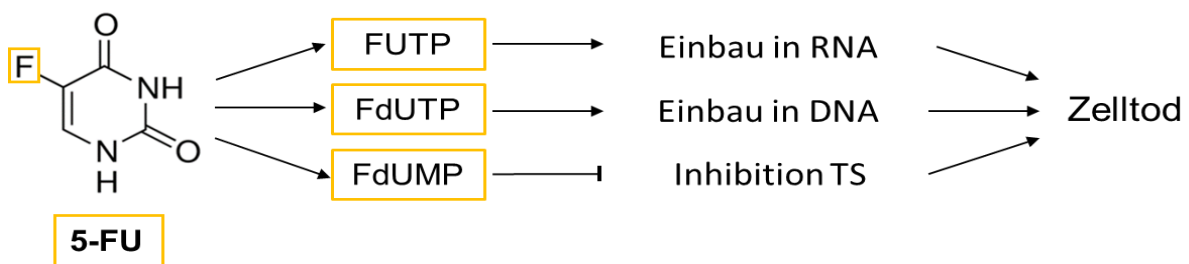
In Deutschland werden als medikamentöse Therapeutika vor allem die beiden klassischen Chemotherapeutika 5-FU und OX verwendet. Für die meisten Patienten erfolgt die Therapie dabei kombiniert nach festgelegten Therapieschemata. Nur bei Kontraindikation gegen OX, wie z. B. periphere Neuropathien oder ein Alter über 70 Jahre, werden 5-FU oder Derivate von 5-FU alleine eingesetzt [40].

Neuere medikamentöse Optionen im Rahmen der sogenannten *targeted* Therapie ergänzen die etablierten Therapiepläne bei bestimmten Tumorkonstellationen. Als *targeted* Therapie werden

Antikörper bezeichnet, die sich gegen Schlüsselmoleküle verschiedener tumorspezifischer Signalwege richten. Es werden in der Tumorthherapie zurzeit vorrangig Antikörper gegen Bestandteile der Signalkaskade für Tumorentstehung, Zellwachstum oder auch Angiogenese eingesetzt. In Kombination mit klassischen Chemotherapien profitieren die für die *targeted* Therapie geeigneten Patientensubgruppen davon deutlich. Zusätzlich haben diese neuen Antikörpertherapien häufig den Vorteil geringerer systemischer Nebenwirkungen im Vergleich zu den klassischen Chemotherapeutika [40-42].

#### 2.1.4.1 5-Fluorouracil

5-FU ist ein etabliertes Medikament in der Behandlung verschiedener Tumore, insbesondere des KRKS. Viele Jahre musste 5-FU in der Krebstherapie intravenös appliziert werden. Heute stehen verschiedene orale Alternativen zur Verfügung. Beispielsweise erleichtert das orale Prodrug Capecitabine dem Patienten die Einnahme. Als Prodrug wird Capecitabine im Körper über verschiedene enzymatische Reaktionen in 5-FU umgebaut [43].



**Abbildung 4 Wirkungsweise von 5-Fluorouracil (modifiziert nach Liu et al. [44])**

Chemische Struktur von 5-fluoro-1H-pyrimidine-2,4-dione (IUPAC) = 5-Fluorouracil. Die Umwandlung von 5-FU in die verschiedenen Pyrimidinnukleotide und Einbau dieser in RNA und DNA. Zusätzlich wird die Thymidilatsynthase von 5-FU direkt inhibiert. Alle Wirkweisen führen über verschiedene Mechanismen zur Induktion des Zelltodes. FUTP = Fluorouracil Triphosphat, FdUTP = Fluoro-desoxyuracil Triphosphat, FdUMP = Fluoro-desoxyuracil Monophosphat, TS = Thymidilatsynthase.

Molekular stellt 5-FU ein Derivat der Pyrimidinbase Uracil dar. Lediglich das Wasserstoffatom an der C-5 Position ist durch ein Fluoratom substituiert. Über verschiedene Transporter wird 5-FU analog zu Uracil in humane Zellen aufgenommen. Intrazellulär werden dann aus 5-FU verschiedene aktive Metabolite mit zytotoxischer Wirkung gebildet [45, 46].

Die zytotoxischen Wirkungen von 5-FU bzw. seiner aktiven Metabolite basieren überwiegend auf zwei Mechanismen (Abb. 3):

- 1.: falscher Einbau von 5-FU in DNA/RNA
- 2.: Inhibition der Thymidilatsynthase.

Als Nukleinbasenanalogen werden 5-FU Metaboliten während der Synthese statt der natürlichen Pyrimidinbasen Cytosin, Thymin und Uracil in die DNA- bzw. RNA-Stränge eingebaut. Die

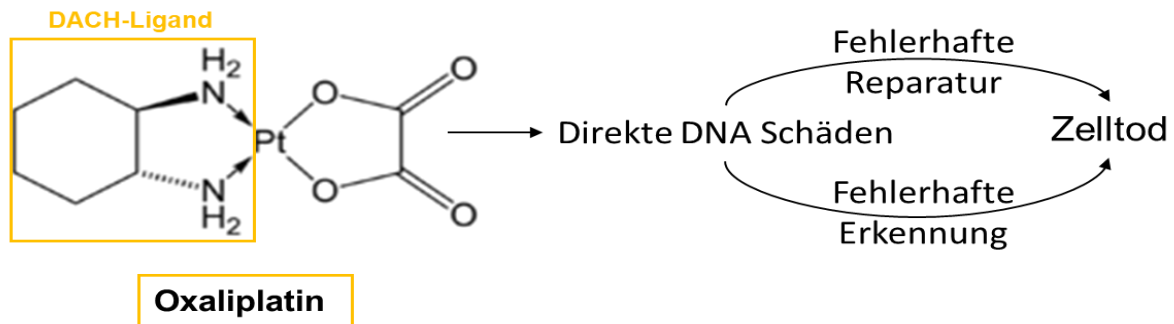
körpereigenen *nucleotide excision repair* (NER) versuchen die fehlerhaften 5-FU Basen zu ersetzen. Bei hoher Konzentration der 5-FU Metabolite werden jedoch statt der körpereigenen Pyrimidinbasen immer wieder die falschen 5-FU Metabolite eingebaut. Dieser frustrane Teufelskreis kann schließlich zu direktem DNA-Strangbrüchen und Zelltod führen [45, 47]. Der fehlerhafte Einbau in die RNA hingegen hemmt die weitere Prozessierung der RNA, die z. B. für die Proteinsynthese von entscheidender Bedeutung ist [45, 48]. All diese zytotoxischen Effekte wirken sich v. a. in Zellen mit einem hohen Bedarf an Nukleinbasen, also Zellen mit starker DNA- und RNA-Synthese, wie Tumorzellen, aber auch Schleimhautzellen aus [45].

Ein zweiter wichtiger Mechanismus der zytotoxischen Wirkung von 5-FU Metaboliten ist die direkte Inhibition des Enzyms Thymidilatsynthase (TS). TS katalysiert die Biosynthese von desoxygeniertem Thymidinmonophosphat (dTMP) aus desoxygeniertem Uracilmonophosphat (dUMP) mittels Übertragung einer Methylgruppe des Folsäurederivat Methylentetrahydrofolat auf dUMP. DTMP ist essenziell für DNA-Replikation und Reparaturmechanismen, fehlt dTMP kommt es zum Einbau falscher Nukleotide. Zudem bedingt das Fehlen einer der vier Nukleinbasen ein Ungleichgewicht des Verhältnisses der Nukleinbasen zueinander. Daraus wiederum resultieren weitere Fehler während der DNA-Synthese, die nicht effizient repariert werden können. So führt die Inhibition der TS über diverse Zwischenschritte zu DNA-Schäden und zum Zelltod [44, 45, 49].

Die zytotoxischen Effekte von 5-FU stehen somit alle im Zusammenhang zu Zellteilungsprozessen. So erklärt sich, dass 5-FU Tumorzellen mit unkontrolliertem Wachstum stärker schädigt als gesunden Zellen des Normalgewebes mit deutlich geringerer Zellteilungsrate. Diese relative Sensitivität macht 5-FU schon seit Jahrzehnten zu einem Chemotherapeutikum der ersten Wahl. Allerdings erklärt es auch die systemischen, unerwünschten Nebenwirkungen auf gesundes, sich schnell teilendes Gewebe wie Haare oder Schleimhäute [45].

### 2.1.4.2 Oxaliplatin

Oxaliplatin (OX) ist ein Zytostatikum und Teil einer ganzen Wirkstoffgruppe an platinhaltigen Medikamenten in der Krebstherapie. Im Gegensatz zu den älteren Generationen wie Cisplatin oder Carboplatin zeichnet sich OX durch verbesserte antineoplastische Eigenschaften und veränderte systemische Nebenwirkungen aus. Strukturell besteht OX aus einem Komplex von Platinion, Oxalatgruppe und DACH-Liganden. Dabei stellt der DACH-Ligand den charakteristischen Unterschied zu den übrigen platinhaltigen Zytostatika wie Cis- bzw. Carboplatin dar [50, 51].



**Abbildung 5 Wirkungsweise von Oxaliplatin [50]**

Chemische Struktur [(1R,2R) -2-azanidylcyclohexyl] azanide,oxalate,platinum(4+) (IUPAC) = OX. OX besteht aus 1,2-Diaminocyclohexyl (kurz DACH) -Ligand, Oxalatgruppe und Platinion. OX führt zu direkten DNA-Schäden wie *inter- und intrastrand crosslinks*, also Quervernetzungen von DNA-Strängen. Diese können nur fehlerhaft repariert oder gar nicht als Fehler erkannt werden, beides führt letztlich zum Zelltod.

Die zytotoxischen Eigenschaften von platinhaltigen Substanzen beruhen auf deren direkter Interaktion mit DNA-Molekülen. Daraus resultieren Querverbindungen zwischen zwei Guaninbasen innerhalb eines DNA-Stranges (*intrastrand crosslinks*) oder zwischen verschiedenen DNA-Strängen (*interstrand crosslinks*). Diese Quervernetzungen stellen direkte Schäden der DNA dar und verhindern in Folge sowohl Replikation als auch Transkription des geschädigten DNA-Abschnittes. Einige dieser Fehler können durch NER vollständig behoben werden. Gelingt es den körpereigenen Reparaturmechanismen jedoch nicht die Schäden vollständig zu reparieren, wird innerhalb der betroffenen Zelle der Zelltod induziert. Einige Querverbindungen werden bereits primär nicht als Schäden erkannt und induzieren erst gar keine Reparaturprozesse. Diese DNA-Schäden akkumulieren daher innerhalb der betroffenen Zellen und führen im Verlauf ebenfalls zur Einleitung der Apoptose. Für beide Mechanismen gilt, dass Gewebe mit hohen Zellteilungsraten und folglich erhöhtem Maß an Replikation und Transkription stärker von den zytotoxischen Effekten betroffen sind [50-52].

Die zytotoxischen Effekte von OX sind im Vergleich zu denen anderer platinhaltiger Zytostatika stärker, weil die Komplexe aus DNA und DACH-Ligand effizienter den Zelltod induzieren. Die entstehenden Addukte aus platinhaltigem DACH-Liganden und DNA-Molekülen können weniger effizient von NER erkannt und folglich weniger effizient repariert werden [50-53].

Die systemischen Nebenwirkungen von OX sind neben den klassischen unerwünschten Arzneimittelwirkungen vieler Chemotherapeutika wie gastrointestinale Beschwerden und Hämatotoxizität, vor allem neurotoxische Effekte [53-56]. Diese Neurotoxizität, die sich überwiegend in Parästhesien und Dysästhesien aber auch in Muskelkrämpfen äußert, ist häufig dosislimitierend und führt in einigen Fällen zum Therapieabbruch. Die Symptome der peripher sensorischen Neuropathie können über Wochen bis Monate anhalten oder gar lebenslang persistieren und führen damit häufig zu einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität der Patienten [55].

Für das KHK hat OX zudem eine besondere Bedeutung, da die klassischen platinhaltigen Zytostatika Cis- und Carboplatin in KHK keine bis sehr wenig zytotoxische Effekte zeigen. Die meisten Zellen



des KRK sind primär resistent gegen diese beiden Platinverbindungen, nicht jedoch gegen das Zytostatikum OX. Mitverantwortlich ist dafür das *Mismatch Repair* (MMR) System, das Schäden der älteren Platinderivate effektiv detektiert und repariert, sogar wenn bereits eine, durch Mutationen bedingte, Defizienz im MMR System vorliegt. DNA-Schäden durch OX können hingegen weder durch native noch durch mutiertes MMR behoben werden [57]. Da MMR Mutationen eine entscheidende Bedeutung in der Tumorgenese des KRKs spielen, sind die Unterschiede zwischen den Cisplatin/Carboplatin und OX in dieser Tumorentität besonders deutlich [43, 50, 51].

## 2.2 Lynch Syndrom und die Zelllinie RKO

### 2.2.1 Lynch Syndrom

Das Lynch Syndrom ist ein familiäres Tumorsyndrom mit Prädisposition für das Hereditäre Nicht-Polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) und weiterer Malignome, wie Endometrium- oder Magenkarzinome. 2-3 % aller KRKs sind durch das Lynch Syndrom bedingt. In Hinblick auf das hohe Erkrankungsrisiko weiterer Familienangehöriger ist es wichtig die betroffenen Patienten sicher zu identifizieren [15, 18].

Genetische Grundlage des Lynch Syndroms sind Mutationen in verschiedenen Genen des *Mismatch Repair* (MMR) Systems, die autosomal-dominant vererbt werden. Betroffen sind die vier Gene MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 [26]. Die Dysfunktionalität des MMR Systems führt über Mikrosatelliteninstabilität zu weiteren Mutationen und letztendlich zur Karzinomentstehung. Mittlerweile sind deutlich mehr als 1000 genetische Varianten des Lynch-Syndroms bekannt, abhängig von der Art und Lokalisation der Mutationen, die dann zur Defizienz des MMR führen [35]. Diese typischen Mutationen können in den Tumoren immunhistochemisch oder per DNA-Sequenzierung nachgewiesen werden. Um eine Patientengruppe zu selektieren, die sicher von der Mutationsanalyse profitiert, wurden die revidierten Bethesda-Kriterien erstellt. Anhand dieser Kriterien kann die Wahrscheinlichkeit für ein Lynch Syndrom unter Patienten mit positiver Familienanamnese, im Sinne positiver Amsterdam-Kriterien, abgeschätzt werden. Nur für Patienten mit erhöhtem Risiko werden anschließend die weiterführenden Untersuchungen angestrebt. Die Amsterdam-Kriterien entsprechen also einer anamnestischen Eingangsprüfung. Die Bethesda-Kriterien dienen der endgültigen Entscheidung über weiterführende HNPCC Diagnostik [58, 59].

Zusätzlich kann die Untersuchung von Mutationen im BRAF-Gen Hinweise für oder gegen HNPCC ergeben. Während BRAF bei sporadischen MSI Tumoren häufig mutiert ist, werden in den hereditären Formen nie BRAF Mutationen nachgewiesen [22].

Patienten mit Lynch Syndrom entwickeln oft bereits im Alter von 20-30 Jahren ein KRK und sind damit durchschnittlich deutlich jünger als Patienten mit sporadischen Karzinomen. Bei den Betroffenen mit Lynch Syndrom ist außerdem das synchrone Auftreten mehrere Karzinome oder das Auftreten verschiedener Tumore in geringem zeitlichem Abstand typisch. Die KRK entwickeln sich verglichen mit den sporadischen Tumoren schneller aus den Vorläuferläsionen. All diese Punkte machen deutlich, dass Patienten mit Lynch Syndrom andere Vorsorgestrategien benötigen, um Vorläuferläsionen abzutragen oder Karzinome möglichst früh zu diagnostizieren. Empfohlen sind routinemäßige Koloskopien alle 1-2 Jahre ab einem Alter von 20-25 Jahre [60-62].

### 2.2.2 Humane Karzinomzelllinie RKO

Die humane Karzinomzelllinie RKO ist primär aus einem Adenokarzinom des Kolons entstanden. Die Zellen sind schlecht differenziert und wachsen adhärent unter Zellkulturbedingungen. Trotz ihres epithelialen Ursprungs sind die Zellen positiv für den mesenchymalen Marker VIMENTIN [63]. Sie enthalten Wildtyp p53, haben also keine Mutation in diesem Gen, und sind heterozygot für BRAF und PIK3CA. Die RKO Zellen weisen über transkriptionelle Stilllegung des hMLH1-Promotors eine Dysfunktion im MMR System auf, sind also mikrosatelliteninstabil (MSI-H) [64].

Diese charakteristischen Eigenschaften unterstreichen, dass es sich bei der RKO Zelllinie um ein Derivat eines HNPCC handelt [65-68].

## 2.3 Histondeacetylasen

Humane Zellen exprimieren 18 verschiedene Histondeacetylasen (HDACs), die nach Homologie zu verschiedenen Hefeenzymen, strukturellem Aufbau und katalytischen Zentren in vier Klassen unterteilt werden:

- Klasse 1: HDAC1, 2, 3, 8
- Klasse 2: a) HDAC4, 5, 7, 9  
b) HDAC6, 10
- Klasse 3: SIRT1-7
- Klasse 4: HDAC11

Die HDACs der Klassen 1, 2 und 3 benötigen Zink für ihre enzymatische Aktivität, während die Klasse 3 Enzyme Nikotinamid (NAD<sup>+</sup>) abhängig sind. Die HDACs der Klasse 1 werden ubiquitär, also in allen Zellen und Gewebearten, exprimiert. Davon sind HDAC1, HDAC2 und HDAC8 vorwiegend im Zellkern lokalisiert [69].

Die Funktion der HDACs ist es, an verschiedenen Proteinen eine Acetylgruppe von Lysin abzuspalten. Ihre Gegenspieler die Histonacetyltransferasen (HATs) katalysieren hingegen die kovalente Bindung von Acetylgruppen an Lysinreste der verschiedenen Proteine. Diese induzierten Veränderungen an den Proteinen finden posttranslational statt und werden damit zu den epigenetischen Modifikationen gezählt, zu denen noch andere chemische Modifikationen wie Methylierung oder Ubiquitynylierung gehören [70, 71].

Entgegen ihres Namens regulieren HDACs und HATs nicht nur die (De-)Acetylierung von Histonen, sondern auch einer Vielzahl weiterer Proteine. Beispielsweise werden Transkriptionsfaktoren, Hormonrezeptoren, Signaltransduktoren oder Zytoskelettproteine durch reversible (De-)Acetylierung modifiziert. Über diese Regulation werden wichtige Funktionen wie der Zellzyklus, die Apoptose oder auch die Zelldifferenzierung beeinflusst. Die Balance zwischen Acetylierung und Deacetylierung ist also mitverantwortlich für viele physiologische Prozesse in gesunden Zellen. Entsprechend werden unterschiedliche Krankheitsprozesse durch ein Fehlen dieses Gleichgewichts gefördert. So konnte in verschiedenen Tumoren eine veränderte Expression von HDACs nachgewiesen werden. Neben Krebs werden zudem auch neurologische oder immunologische Erkrankungen wie Alzheimer Demenz oder chronisch obstruktive Lungenerkrankungen durch HDACs beeinflusst [72-74].

HDACs und HATs beeinflussen die Aktivität bestimmter Gene über die Veränderung des Kondensationsgrads des Chromatins, einem Komplex aus DNA, Histonen und Nicht-Histon Strukturproteinen. Zwei wesentliche Kondensationsgrade des Chromatins werden unterschieden, Euchromatin und Heterochromatin, die sich im Packungsgrad von DNA und Strukturproteinen unterscheiden. Im Heterochromatin liegt eine hohe elektrostatische Anziehung von positiven

Gruppen der Strukturproteine und der negativ geladenen DNA vor, was zum engen Packungsgrad des Heterochromatins und damit zur genetisch und transkriptionellen Inaktivierung der entsprechenden DNA-Abschnitte führt. Im Gegensatz dazu führen negative Ladungen der Strukturproteine im Euchromatin zu einem geringen Packungsgrad, was die genetische und transkriptionelle Aktivität erhöht. Die Deacetylierung von HDACs am positiv geladenen Lysinresten der Histone führt dementsprechend vermehrt zu inaktivem Heterochromatin. Vereinfacht kann man die HDACs demnach als Repressoren der Transkription ansehen [73, 75].

Obwohl alle 18 HDACs prinzipiell die identische biochemische Reaktion katalysieren, haben die einzelnen Enzyme dennoch unterschiedliche physiologische Funktionen und dürfen nicht als vollkommen redundant betrachtet werden. Während die Funktion einer HDAC in einigen Zellsystemen vollständig durch andere HDACs kompensiert werden kann, führt in anderen Zellsystemen bspw. bereits der Verlust einer einzelnen HDAC zu ineffektiver Zellzyklusregulation [8, 76].

### 2.3.1 Rolle von HDAC2 in Karzinomen

Besonders die HDACs der Klasse 1 regulieren wichtige Prozesse der Zellteilung, Zelldifferenzierung oder des Zelltodes. HDAC2, als ein Enzym dieser Klasse, modifiziert verschiedene Transkriptionsfaktoren mit direktem Einfluss auf das Überleben der Zelle oder ihren Zelltod. Beispielsweise wird der Tumorsuppressor p53 und damit die Apoptose der Zelle direkt durch HDAC2 inhibiert [77]. Die Zellteilung wird hingegen durch HDAC2 gefördert, in dem das Protoonkogen MYC aktiviert wird [8, 78]. Sowohl p53 als auch MYC stellen Schlüsselstellen in der Entstehung vieler Malignome dar. Die direkte Beeinflussung beider durch HDAC2 verdeutlicht die Bedeutung von HDAC2 in Tumorgenese, Aufrechterhaltung und Überleben des Tumors. Bestätigend konnte in Studien gezeigt werden, dass eine Überexpression von HDAC2 Apoptose verhindert und Proliferation fördert, wohingegen das Fehlen von HDAC2 zu gesteigerten Zelltodraten führt [77, 79]. Ebenso konnte in vielen Karzinomen des Kolons eine aberrante Expression von HDAC2 nachgewiesen werden [74, 80]. Bereits in den Vorläuferläsionen, den Kolonpolypen, konnte verglichen mit normaler Mukosa ein höheres Level von HDAC2 nachgewiesen werden [81]. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es vorstellbar, dass Veränderungen in der Expression von HDAC2 bereits frühe Schritte der Tumorgenese beeinflussen. Die exakte Rolle der HDACs in diesen komplexen Vorgängen ist jedoch noch nicht vollständig entschlüsselt [81].

## 2.3.2 Inhibitoren von Histondeacetylasen

Für eine zunehmende Anzahl an Erkrankungen werden Hinweise gefunden, dass die Entstehung oder Aufrechterhaltung der Erkrankung unter anderem von HDACs beeinflusst wird [8, 73]. HDACs stellen so einen möglichen Angriffspunkt neuer Therapien dar. Es gibt mittlerweile eine Reihe von Inhibitoren (HDACi), die entweder alle HDACs oder selektiv nur einzelne Klassen oder gar einzelne Enzyme inhibieren [69, 82].

Diese HDACi zeigen abhängig von den von ihnen inhibierten Enzymen, der betrachteten Zellart und Erkrankung unterschiedliche Effekten. So führt in Tumorzellen die Hemmung unterschiedlicher HDACs z. B. zur Induktion von Zelltod, Zellzyklusarrest oder einer verbesserten Erkennung der Tumorzellen durch Immunzellen. [74]. HDACi werden hierzu bereits in verschiedenen klinischen Studien untersucht und können damit vermutlich ein zukünftig wichtiger Baustein in der Therapie unterschiedlicher Malignome oder anderer Erkrankungen darstellen [83-85]. Besonders positive Effekte zeigen sich hierbei bei der Kombination dieser HDACi mit etablierten, antineoplastischen Therapeutika oder Radiotherapie [86]. HDAC2 als ein ubiquitär exprimiertes Enzym, das eine Reihe von Erkrankungen beeinflusst und auf dem daher auch in dieser Arbeit ein spezielles Augenmerk liegt, kann dabei pharmakologisch mit Hilfe verschiedener Inhibitoren gehemmt werden. Jedoch kann HDAC2 derzeit pharmakologisch nicht selektiv allein, sondern nur in Kombination mit anderen HDACs inhibiert werden. Daher sind *in vitro* Untersuchungen, wie diese hier vorliegende, auf die praxisnahe pharmakologisch-kombinatorische Hemmung mehrerer HDACs oder die gezielte genetische Deletion der HDAC2 Expression angewiesen, die bisher jedoch kaum klinische Relevanz besitzt [82].

### 2.3.2.1 Entinostat (MS-275)

Entinostat oder MS-275 ist ein HDACi, der selektiv Klasse 1 HDACs hemmt. Aus klinisch medizinischer Sicht kann dabei der Hemmung der HDACs 1, 2 und 3 eine größere Bedeutung beigemessen werden, als der Hemmung der HDAC8 [87, 88]. Strukturell betrachtet stellt MS-275 dabei ein Derivat von Benzamid dar, das antineoplastische Eigenschaften in verschiedenen Karzinomzelllinien zeigt [89].

Diesen präklinischen Ergebnissen zur Wirksamkeit von MS-275 in der Tumorthherapie folgen zurzeit eine Vielzahl unterschiedlicher *in vivo* Untersuchungen sowie bereits der erste Einsatz im Rahmen klinischer Studien. In diesen klinischen Studien werden überwiegend Kombinationstherapien aus MS-275 und anderen Standardtherapien untersucht, da die meisten HDACi präklinisch ihre Wirksamkeit besonders in der Ergänzung bestehender Therapien zeigen. Die Studien schließen Patienten mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen wie etwa Brust-, Darm-, oder verschiedene

Formen des Blutkrebses, ein [90]. So kann untersucht werden, ob MS-275 möglicherweise die Therapie dieser Malignome zukünftig ergänzen und verbessern kann [90-92].

Im Gegensatz zu anderen HDACi, die bereits regulär in der Behandlung verschiedener Erkrankungen eingesetzt werden, wie etwa Valproinsäure bei Epilepsien oder Panobinostat beim Multiplen Myelom, gibt es für MS-275 bisher keine Arzneimittelzulassung und kann daher klinisch noch nicht als Therapeutikum eingesetzt werden [93, 94].

### 2.3.2.2 Panobinostat (LBH-589)

Panobinostat oder LBH-589 ist ebenfalls ein HDACi. Chemisch handelt es sich bei LBH-589 um ein Derivat der Hydroxamidsäure. LBH-589 hemmt unselektiv alle vier Enzymklassen der HDACs. Es handelt sich demnach um einen Pan-Inhibitor der HDACs. Die Applikation des aktiven Stoffes ist sowohl oral wie auch intravenös möglich [85, 95].

LBH-589 zeigt bisher ein hohes therapeutische Potential aufgrund seiner antineoplastischen Effekte und ist daher zum Beispiel bereits für die Kombinationsbehandlung des rezidivierenden Multiplen Myeloms zugelassen. Patienten, die bereits zweimal wegen eines Multiplen Myeloms behandelt wurden, zeigen bei der dritten Behandlung nach der Kombination von Farydak, zugelassener Handelsname von LBH-589, mit den beiden Standardtherapeutika Bortezomib und Dexamethason eine langsamere Progression verglichen mit der alleinigen Standardtherapie ohne Farydak. Für Patienten mit weitfortgeschrittenen, schwer behandelbaren Multiplen Myelomen bietet LBH-589 so eine Möglichkeit der weiteren Therapieeskalation, sollten die oben genannten klinisch üblichen Therapieoptionen bereits ausgeschöpft sein [94, 96].

Zudem werden zurzeit eine Reihe weiterer klinischer Studien durchgeführt, die den therapeutischen Einsatz von LBH-589 bei unterschiedlichen malignen Erkrankungen überprüfen [97]. Momentan wird beispielsweise in einer multizentrischen Phase 1b Studie (NCT02890069) untersucht, welchen Einfluss LBH-589 in der Kombinationsbehandlung verschiedener Krebserkrankungen, wie etwa KRK oder das Adenokarzinom der Lunge, hat [98]. So könnte LBH-589 über das Multiple Myelom hinaus bei weiteren Krebserkrankungen verschiedenen Ursprungs neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen. Präklinisch konnte der Benefit einer Kombinationsbehandlung mit LBH-589 bspw. in Zelllinien eines Adenokarzinoms der Lunge gezeigt werden. Diese aussichtreichen Ansatzpunkte müssen sich zukünftig jedoch in klinischen Studien bestätigen lassen, bevor LBH-589 auch in der Behandlung anderer Krebserkrankungen eingesetzt werden kann [99, 100].

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte und Verbrauchsmittel

Geräte/Verbrauchsmittel	Hersteller
Absaugpumpe Vacusafe	Integra Biosciences, Biebertal
Blot-Kammer: Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, München
CO2 Inkubator: Heracell™ 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Durchfluscytometer FACSCanto™ II	BD Biosciences, Heidelberg
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Eppendorf Tubes®	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Feinwaage Basic	Sartorius, Göttingen
Gelgießapparatur	Bio-Rad, München
Laser Scanning Mikroskop, LSM 710	Carl Zeiss, Jena
Lichtmikroskop Primovert	Carl Zeiss, Jena
Microplate Reader Sunrise™ RC	Tecan, Männedorf, CH
Nitrozellulosemembran Amersham Protran 0.2NC	GE Healthcare, Little Chalfont, GB
Objektträger	Sigma-Aldrich, München
Phasenkontrastmikroskop, Axiovert 35	Carl-Zeiss, Jena
Pipet X	Mettler-Toledo, Gießen
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Biebertal
Pipette AutoRep™ E	Rainin Mettler-Toledo, Gießen
Pipette Pipet-Lite XLS	Rainin Mettler-Toledo, Gießen
Rocking Platform	VWR, Radnor, US
Rollenmischer RS-TR05	Phoenix Instruments, Garbsen
Rührplattform Variomag Mono	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Spannungsquelle PowerPac™ HC	Bio-Rad, München
Sterilbank LaminAir HB2472	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
ThermoMixer® C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Carl-Roth, Karlsruhe
Ultraschallgerät UP200Ht	Hielscher, Tetlow
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, US
Waage Junior 500	Precisa, Dietikon, CH
Wasserbad AQUAline AL5	LAUDA, Lauda-Königshofen
Western Blot Detektor Odyssey	LI-COR Biosciences, Lincoln, US
Zählkammer Neubauer	Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen
Zentrifuge Heraeus Fresco21	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Zentrifugenröhrchen/ Falcon-Tubes	Greiner, Frickenhausen

**Tabelle 1 Geräte und Verbrauchsmittel**

Die Tabelle zeigt die für diese Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmittel/Plastikware mit Hersteller.



### 3.1.2 Spezielle Chemikalien und Verbrauchsmittel

Spezielle Chemikalien/Verbrauchsmittel	Hersteller
Aceton	Allied Signal, Seelze
Annexin V-FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
BD FACSClean Lösung	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACSRinse Lösung	BD Biosciences, Heidelberg
BD™ FACSToP™	BD Biosciences, Heidelberg
Coomassie® Brilliantblau	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure	AppliChem, Darmstadt
Fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Ladepuffer: PageRuler Plus Prestained	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche, Basel, CH
TO-PRO-3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Trypanblau	Bio-Rad, München
Trypsin/EDTA Lösung	Biochrom, Berlin
Vectashield®	Vector Laboratories, Burlingame, US

**Tabelle 2 Spezielle Chemikalien und Verbrauchsmittel**

Die Tabelle zeigt die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmittel mit Hersteller. Sofern nicht gesondert vermerkt, wurden Chemikalien und Zellkulturmedien der Firmen Sigma-Aldrich, München oder Carl-Roth, Karlsruhe verwendet, sowie Verbrauchsmaterialien bzw. Plastikware von Greiner, Frickenhausen.

### 3.1.3 Puffer- und Stammlösungen

Puffer- und Stammlösung	Zusammensetzung
10 x TBS-Puffer (pH = 7,6)	20 mM Tris 1,4 M NaCl ad. 1L Aqua dest.
10 x Annexin-Bindepuffer	100 mM HEPES (pH = 7,4) 1,4 M NaCl 25 mM CaCl <sub>2</sub> 1 % BSA
5 x Lämmli Stammlösung	30g Tris 250mM 144g Glycin 1,92 M ad. 1L Aqua dest.
6 x Probenpuffer	375 mM Tris (pH = 6,8) 12 % SDS 30 % Glycerin 500 mM DTT 0,01 % Bromphenolblau
APS-Lösung 10%	1 g APS ad. 10 ml Aqua dest.
Blockpuffer	5% BSA 0,3% Triton-X-100 PBS

## Material und Methoden

Blotpuffer	100 mL 5 x Lämmli-Puffer 200 mL Ethanol ad. 1 L Aqua dest.
Bradford Reagenz	50 mg Coomassie® Brillantblau 25 mL Ethanol (99,9 %) 50 mL Phosphorsäure (85%) ad. 500 mL Aqua dest.
NET-N Lysepuffer 0,5 %	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCL (pH = 8) 10 % Glycerin 1 mM EDTA 0,5 % NP-40 Proteaseinhibitorcocktail
PBS (pH = 7,4)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,7 mM CaCl <sub>2</sub> 6 mM MgCl <sub>2</sub>
SDS-PAGE Trenngel 8 %	6,3 mL Aqua dest. 3 mL Tris-HCl 1,5 M (pH = 8,8) 120 µL SDS 10% (w/v) 2,4 mL Acrylamid 0 µL APS 10% (w/v) 6 µL TEMED
SDS-PAGE Trenngel 15 %	4,3 mL Aqua dest. 3 mL Tris-HCl 1,5 M (pH = 8,8) 120 µL SDS 10% (w/v) 4,5 mL Acrylamid 60 µL APS 10% (w/v) 6 µL TEMED
SDS-PAGE Sammelgel	4,4 mL Aqua dest. 760 µL Tris-HCl 1M (pH = 6,8) 60 µL SDS 10% (w/v) 760 µL Acrylamid 60 µL APS 10% (w/v) 6 µL TEMED
TBS-T	100 mL 10 x TBS 5 mL Tween® 20 ad. 1 L Aqua dest.

**Tabelle 3 Puffer- und Stammlösung**

Die Tabelle zeigt alle verwendeten Puffer- und Stammlösungen mit entsprechender Zusammensetzung.

### 3.1.4 Antikörper

Primärantikörper	Eigenschaften	Verdünnung	Hersteller
Anti-ACH3	Polyklonal, Kaninchen	1:1000	Merck, Darmstadt
Anti-β-ACTIN	Monoklonal, Maus	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg,
Anti-ACTUB	Monoklonal, Maus	1:2000	Sigma-Aldrich, München
Anti-β-CATENIN	Monoklonal, Maus	1:5000	BD Biosciences, New York, US
Anti-HDAC1*	Monoklonal, Maus	1:1000	Merck, Darmstadt
Anti-HDAC2	Monoklonal, Maus	1: 1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-HDAC2*	Monoklonal, Maus	1:400	Cell Signaling Technology, Leiden, NL
Anti-HDAC3	Monoklonal, Kaninchen	1:1000	Abcam, Cambridge, GB
Anti-HDAC6	Monoklonal, Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, Leiden, NL
Anti-HSP90	Monoklonal, Maus	1:1000	Enzo Life Sciences, Lörrach
Anti-TS	Monoklonal, Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, Leiden, NL
Anti-VIMENTIN [V9]	Monoklonal, Maus	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US

**Tabelle 4 Primärantikörper**

Die Tabelle zeigt alle in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper mit Hersteller und verwendeter Verdünnung. Die mit \* markierten Antikörper wurden für die indirekte Immunfloreszenz verwendet.

Detektionsantikörper	Eigenschaften	Verdünnung	Hersteller
Anti- IgG- Kaninchen	IRDye 800CW	1:10000	LI-COR Biosciences, Lincoln, US
Anti- IgG- Kaninchen	IRDye 680RD	1:10000	LI-COR Biosciences, Lincoln, US
Anti- IgG- Maus	IRDye 800CW	1:10000	LI-COR Biosciences, Lincoln, US
Anti- IgG- Maus	IRDye 680RD	1:10000	LI-COR Biosciences, Lincoln, US
Anti- IgG- Maus*	Alexa Fluor 488	1:400	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US

**Tabelle 5 Sekundäre Detektionsantikörper**

Die Tabelle zeigt alle in dieser Arbeit verwendeten sekundären Detektionsantikörper mit Hersteller und verwendeter Verdünnung. Die mit \* markierten Antikörper wurden für die indirekte Immunfloreszenz verwendet

### 3.1.5 Inhibitoren

Inhibitoren	Hersteller
Oxaliplatin	Sigma-Aldrich, München
5-Fluorouracil	Sigma-Aldrich, München
Panobinostat (LBH589)	Selleckchem, München
Entinostat (MS-275)	Selleckchem, München

**Tabelle 6 Inhibitoren**

Die Tabelle zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren mit Hersteller.

### 3.1.6 Zelllinien

Bei allen verwendeten Zelllinien handelt es sich um Derivate der humanen Kolonkarzinomzelllinie RKO. Alle vier Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) mittels DNA Fingerprinting sicher als humane RKO Zellen authentifiziert (Abb. A1/2).

Das STR-Profil wurde mit den Referenzen verschiedener Zelldatenbanken verglichen und stimmte in allen Fällen mit der Referenz der kolorektalen Karzinomzelllinie RKO überein. Die gefundenen Unterschiede im STR-Profil lassen sich durch die Mikrosatelliteninstabilität der RKO Zelllinie erklären. Es handelt sich um ausschließlich menschliche Zellen ohne Kontamination mit anderen Säugetierzellen (Abb. A1, A2).

Name	HDAC2 Status	Herkunft
RKO-ATCC	Wildtyp/ mutiert	ATCC®, Erstbeschreibung durch MC Hollander [66]
RKO-ES	mutiert	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Esteller [78]
RKO HDAC2 positiv	Wildtyp	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
RKO HDAC2 negativ	mutiert	Im Rahmen dieser Arbeit generiert

**Tabelle 7 Verwendete Zelllinien**

Die Tabelle zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien mit zugehörigem HDAC2 Status und ihrer Herkunft. Die Benennung wurde gewählt, um die Zelllinie mit unterschiedlichem Ursprung klar voneinander abzugrenzen. Die RKO-ATCC Zelllinie, aus der offiziellen ATCC® Zelldatenbank, wird von in dieser Arbeit als Ursprungszelllinie angesehen.

### 3.1.7 Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Adobe Photoshop CC2018	Adobe Systems Software, Dublin, IE
BD FACSDIVA™ Software	BD Biosciences, Heidelberg
Flowing Software	TUCS, Turku, FIN
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc., La Jolla, US
Image Studio Lite Version 5.2	LI-COR Biosciences, Lincoln, US
LSM Image Browser	Carl-Zeiss, Jena
Microsoft Office 2016	Microsoft, Redmond, US
Odyssey Software	LI-COR Biosciences, Lincoln, US
Zen Software	Carl-Zeiss, Jena

**Tabelle 8 Software**

Die Tabelle zeigt die für diese Arbeit verwendete Software mit Hersteller.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

#### 3.2.1.1 Kultivierung der Zelllinien

Die beiden verwendeten Zelllinien RKO-ATCC und RKO-ES wurden zu Beginn der Arbeit aus der dauerhaften Lagerung in Flüssigstickstoff in Kultur genommen. Dazu wurden die Kryoröhrchen, in denen die Zellen gelagert werden, in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend zu 5 mL Medium in eine Zellkulturflasche gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um das Frostschutzmittel DMSO, in dem die Zellen im Flüssigstickstoff konserviert werden, zu entfernen.

Kultiviert wurden die Zelllinien im CO<sub>2</sub>- Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre. Verwendet wurde für alle Zelllinien das Kulturmedium DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/ Streptomycin. Für die Erhaltungskultur wurden die Zellen zweimal wöchentlich passagiert. Dafür wurde das Medium entfernt, die Zellen in 2 mL PBS gewaschen und mit 1 mL Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 2 mL DMEM aufgenommen in ein 15 mL Falcon überführt und bei 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 mL Medium resuspendiert und anteilig zu neuem Medium in die Kulturflasche gegeben. Das Verhältnis der Passage wurde entsprechend der anfänglichen Zelldichte bestimmt. Typische Passage im Verhältnis 1: 20 bei annähernd bedeckter Bodenfläche. Zur Aussaat für die einzelnen Versuche wurde nach Zentrifugation und Resuspension die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Zur Unterscheidung zwischen vitalen und toten/absterbenden Zellen diente dabei die Färbung mit Trypanblau. Die Zellzahl in einem Milliliter der Zellsuspension berechnet sich folgendermaßen:

$$\text{Zellzahl/mL} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen in 4 Quadraten}}{2} \times \frac{10^4}{\text{mL}} .$$

Für die Aussaat einer definierten Zellzahl wurde anschließend das benötigte Volumen der Zellsuspension wie folgt bestimmt:

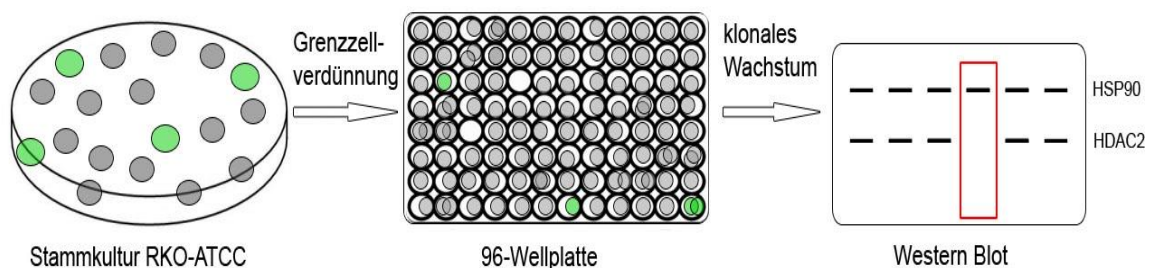
$$\text{Volumen der Zellsuspension [mL]} = \frac{\text{gesuchte Zellzahl}}{\text{gezählte Zelldichte}_{\text{mL}}} .$$

Für die Aussaat in 6-Well-Platten wurden  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 2 mL Medium ausgesät. In die 6 cm Schalen entsprechend  $5 \times 10^5$  Zellen in 5 mL Medium. Die Zelldichte wurde so gewählt, dass während der Versuchsdauer ein exponentielles Wachstum möglich war, sofern dies nicht durch die verwendeten Inhibitoren verhindert wurde.

Die Zelllinien wurden zur Kryokonservierung für weiterführende Untersuchungen in Flüssigstickstoff überführt. Dazu wurden die Zellen analog zur Erhaltungskultur gewaschen, abgelöst und

zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS resuspendiert und die Lösung ein zweites Mal bei 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert wurde, um möglichst alle Abbauprodukte und Verunreinigungen zu entfernen. Nach erneutem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet im Einfriermedium (90 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert und in die Kryoröhrchen überführt. Diese wurden zunächst bei -80 °C eingefroren, bevor sie zur endgültigen Lagerung in den mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank überführt wurden. Es wurden circa  $5 \times 10^6$  Zellen pro Kryoröhrchen in 500  $\mu$ L Einfriermedium konserviert.

### 3.2.1.2 Grenzzellverdünnung zur Gewinnung von Einzelzellklone



**Abbildung 6 Ablauf der Selektion der Einzelzellklone**

Die Abbildung zeigt schematisch den Ablauf der Grenzzellverdünnung zur Gewinnung von Einzelzellklonen und die anschließende Charakterisierung im Western Blot. Grau dargestellt sind HDAC2 positive Zellen, grün HDAC2 negative Zellen. Im Western Blot ist der HDAC2 negative Zellklon rot markiert.

Für die Grenzzellverdünnung wurden die RKO-ATCC Zellen aus der Stammkultur zunächst unter dem Mikroskop gezählt. Mit bekannter Zelldichte der Zellsuspension wurde eine Grenzzellverdünnungslösung angesetzt, in der die Zelldichte 1 Zelle/ 100  $\mu$ L Medium betrug. Jeweils 100  $\mu$ L dieser Verdünnung wurden pro Well in eine 96-Well-Platte pipettiert, um so möglichst exakt eine Zelle pro Well zu kultivieren.

Die 96-Well-Platte wurde regelmäßig lichtmikroskopisch betrachtet und die Zellen beurteilt.

Nach circa 10 Tagen konnten dann unter dem Lichtmikroskop die Wells ausgewählt werden, in denen genau eine kreisrunde Kolonie, also eine Kolonie aus einer einzelnen Ursprungszelle, entstanden ist. Diese Kolonien wurden täglich begutachtet und bei zu hoher punktueller Zelldichte in der 96-Well-Platte vereinzelt. Dazu wurde das Medium vorsichtig abgenommen und die Zellen mit 50  $\mu$ L PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen mit 10  $\mu$ L Trypsin/EDTA abgelöst. Die in Trypsin gelösten Zellen wurden mittels Pipette und 100  $\mu$ L Medium, unter mehrfachem Aufnehmen und Ablassen der Suspension, innerhalb des Wells verteilt.

Bei zu circa 80 % bedeckter Bodenfläche des Wells wurden die Zellklone zum weiteren Wachstum erst in eine 12-Well-Platte und nach weiteren 5 Tagen in eine 6-Well-Platte überführt.

Aus der 6-Well-Platte wurden Zelllysate hergestellt, um die Klone hinsichtlich ihrer HDAC 2 Expression mittels Western Blot Analyse zu selektieren.

## 3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.2.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Für die Ernte der adhärennten Zellen aus den Kulturschalen wurde zunächst der Überstand abgenommen und in ein 15 mL Falcon überführt. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin/EDTA vom Kulturboden abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden mit Medium aufgenommen und zum Überstand in das Falcon gegeben. Danach wurde die Schale erneut mit PBS gewaschen und die Flüssigkeit ebenfalls ins Falcon überführt. Die Falcons werden während der gesamten Ernte in Eis gekühlt.

Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 mL PBS resuspendiert. 500 µL dieser Suspension wurden für die Analyse mit dem Durchflusszytometer separat weiter fixiert (s. 3.2.5.1).

Die andere Hälfte wurde in Eppendorf-Gefäße überführt und 5 Minuten bei  $13,3 \times 10^3$  rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und das Zellpellet anschließend in Lysepuffer (NET-N Lysepuffer mit 1:100 Phosphataseinhibitor und 1:1000 1M DTT) gelöst. Nach 30 Minuten Inkubationszeit auf Eis wurden die Zelllysate sonifiziert. Zuletzt wurden die Lysate 15 Minuten bei  $13,3 \times 10^3$  rpm und 4°C zentrifugiert, das Lysat in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte die photometrische Messung nach der Methode von Bradford [101].

Zur Durchführung der Proteinbestimmung wurden eine 1:10 Verdünnung der Lysate (3 µL Lysat + 27 µL Aqua dest.) und eine Eichgerade aus einer Konzentrationsreihe mit BSA angesetzt. 10 µL der verdünnten Lysate wurden mit 200 µL Bradford Reagenz versetzt und nach 5 Minuten lichtgeschützter Inkubationszeit wurde die Platte mit dem Microplate Reader Sunrise™ RC detektiert. Für die Western Blot Analyse können die Lysate in ihrem Proteingehalt aneinander angeglichen werden, in dem sie mit Aqua dest. verdünnt wurden.

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

Die SDS-Page dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht.

Zur Denaturierung wurden den Proben (Mischung aus Lysat und Aqua dest. mit einem Proteingehalt von 30 µg)  $\frac{1}{6}$  des Gesamtvolumens an 6x Ladepuffer zugegeben und diese dann für 5 Minuten



bei 95 °C erhitzt. Die Ladetaschen des Sammelgels wurden mit den Proteinextrakten sowie einmal mit 3-5 µL Proteinmarker, zur Bestimmung der Proteingröße, beladen. Für die Detektion größere Proteine wurden als Trenngele 8 % Acrylamid-Gele, zur Detektion kleinere Proteine 15 % Acrylamid-Gele verwendet. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 95 V gestartet und schrittweise auf 125 V erhöht.

### 3.2.2.4 Western Blot

Zur Übertragung der aufgetrennten Proteine aus dem Acrylamid-Gel auf eine adsorbierende Nitrozellulosemembran wurde die Western Blot Methode verwendet.

Die Membran und das Acrylamid-Gel wurden mit Filterpapier und Schaumstoffpolstern in die Blottingapparatur, die mit Blotpuffer gefüllt ist, eingebracht. Der Blotvorgang dauert bei konstanter Stromstärke von jeweils 175 mA für jedes Gel 2 h 10 min.

Nachdem der Proteintransfer abgeschlossen ist, wird die Membran zweimal für 5 Minuten in TBS-T gewaschen, um den im Blotpuffer enthaltenen Ethanol auszuwaschen. Anschließend wird die Membran für eine Stunde in 5 % Milchpulver-TBS-T-Lösung geblockt, damit die freien Proteinbindungsstellen der Nitrozellulosemembran gebunden werden. Dies soll während der Detektion mittels Antikörper unspezifische Bindungen verhindern. Nach dem Blocken wird die Membran dreimal für jeweils 5 Minuten in TBS-T gewaschen. Die Membran kann jetzt entsprechend zugeschnitten und für die Proteindetektion verwendet werden.

### 3.2.2.5 Proteindetektion

Die Nitrozellulosemembran wurde über Nacht bei 4 °C mit einem Primärantikörper (verdünnt nach Herstellerangabe in 2 % Milchpulver-TBS-T-Lösung, s. Tab. 1) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für 5 Minuten in TBS-T gewaschen und anschließend lichtgeschützt für 2 h in dem frisch angesetzten und Sekundärantikörper (1:10000 in 2 % Milchpulver-TBS-T-Lösung verdünnt, s. Tab. 2) gefärbt. Die Membran wurde nach der Zweiantikörperfärbung dreimal lichtgeschützt für 5 Minuten in TBS-T gewaschen. Das Fluoreszenzsignal des Infrarot-Farbstoffgekoppelten Sekundärantikörpers wurde mittels des LI-COR® Odyssee-Systems analysiert.

### 3.2.2.6 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist eine immunhistochemische Methode zum Nachweis zellulärer Proteine mittels spezifischem Primärantikörper und Fluoreszenz-markiertem Sekundärantikörper.

Für die Immunfluoreszenz wurden 300.000 Zellen auf das, in einer 3,5 cm Schale liegende, Deckglas ausgesät.

Am nächsten Tag wurden die Deckgläser zweimal in warmen PBS gewaschen und anschließend in einer auf – 20 °C vorgekühlten Methanol/Aceton-Lösung für 9 Minuten bei – 20 °C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Deckgläser dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen, um die Deckgläser danach mit 100 µL Blockpuffer (5 % BSA in 0,3 % Triton-X-100/PBS) pro Deckglas in einer feuchten Kammer für 1 h bei Raumtemperatur zu inkubieren. Anschließend wurde der Blockpuffer entfernt und 100 µL des Primärantikörpers (1: 400 in 1 % BSA in 0,3 % Triton-X-100/PBS) auf die Deckgläser gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als nächstes wurden die Deckgläser erneut dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen und danach mit 100 µL des Sekundärantikörpers Alexa Fluor 488 (1: 400 in 0,3 % Triton-X-100/PBS) für 3 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Inkubation und alle weiteren Schritte wurden lichtgeschützt durchgeführt. Nach erneutem Waschen wurden die Zellkerne mit 150 µL TO-PRO-3 angefärbt, die Deckgläser kurz in Wasser gespült und mit einem Tropfen Vectashield® Eindeckmedium auf die Objektträger gegeben.

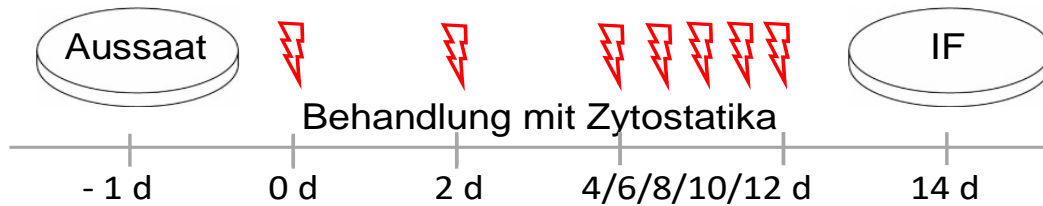
Die Präparate wurden bis zur Analyse mit dem Laser Scanning Mikroskop (LSM 710) bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

### 3.2.3 Behandlung mit Inhibitoren

Für die Behandlung mit den verschiedenen Inhibitoren wurden die adhärennten Zellen einen Tag vor der Behandlung (t = -24h) ausgesät. Die Zelldichte für die Aussaat wurde so gewählt, dass während des gesamten Experiments ein exponentielles Wachstum möglich war. Entsprechend jeder Behandlung wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt.

Behandelt wurde für alle Endpunkte einmalig unter sterilen Bedingungen (t = 0), um die Zellen entsprechend nach 24 h bzw. 48 h getrennt zu ernten. Für die Zelltodanalysen der vitalen Zellen wurden die Zeitwerte hingegen getrennt behandelt und dafür die verschiedenen Endpunkte gemeinsam geerntet, da die Zellen hier direkt und unfixiert am Durchflusszytometer gemessen wurden.

Für die unterschiedlichen Versuche wurden die Zytostatika 5-FU und OX sowie die HDAC-Inhibitoren Panobinostat (LBH589) und Entinostat (MS-275) verwendet. Die verwendeten Konzentrationen werden für jeden Versuch separat in der Ergebnisdarstellung angeben.



**Abbildung 7 Behandlungsschema Langzeitversuche**

Die Abbildung zeigt schematisch den Versuchsaufbau für die Langzeitbehandlung mit den beiden Zytostatika 5-FU und OX. Die Behandlungstage sind entsprechend mit roten Blitzen hervorgehoben.

In den Langzeitversuchen wurden die Zellen über 12 Tage alle 2 Tage mit den verschiedenen Inhibitoren behandelt. Es wurden in getrennten Versuchen die beiden Zytostatika 5-FU und OX jeweils in der Konzentration 2  $\mu$ M verwendet. Gleichzeitig mit der Behandlung fand der regelmäßige Mediumwechsel in den Kulturplatten statt. An Tag 14 wurden die Zellen dann für die Immunfluoreszenz vorbereitet und ausgesät (s. 3.2.2.6).

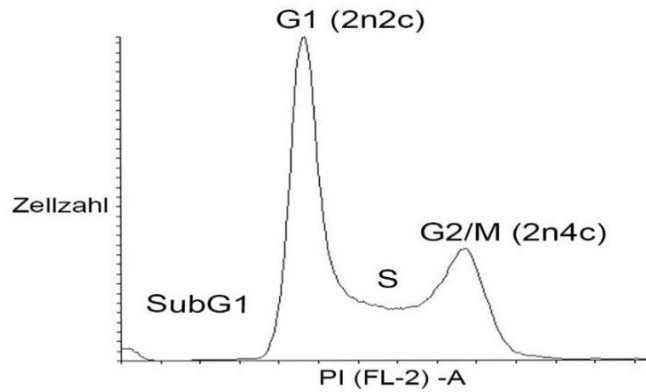
### 3.2.4 Analysen mittels Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden die Zellen in einer Einzelzellsuspension an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Dabei wird das Licht des Lasers an den Zellen gebrochen und als Streulicht im *forward scatter channel* (FSC) und *side scatter channel* (SSC) detektiert. Der FSC ist dabei ein Maß für die Zellgröße, SSC für die Granularität der Zellen. Neben diesen morphologischen Charakteristika lassen sich durch die Färbung mit fluoreszierenden Farbstoffen weitere Eigenschaften untersuchen.

#### 3.2.4.1 Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid (PI) Färbung

Für die Zellzyklusanalyse wird der Fluoreszenzfarbstoff PI verwendet, der in die Nukleinsäuren interkaliert. Die Fluoreszenz einer Zelle ist proportional zu ihrem DNA-Gehalt. Diese Färbung wird folglich dazu genutzt den DNA-Gehalt bzw. den Zellzyklusstatus einzelner Zellen oder einer Zellpopulation zu bestimmen.

Ein Zellzyklusprofil zeigt charakteristischerweise einen G1- und einen G2/M-Peak, wobei der G2/M-Peak wegen des doppelten DNA-Gehaltes der Zellen mit doppelter Intensität fluoresziert. Zellen in der S-Phase zeigen eine Fluoreszenz, die in der Intensität zwischen diesen beiden Peaks liegt. In der Zellzyklusanalyse werden auch Zellen mit subdiploidem DNA-Gehalt detektiert, diese Zellen haben keine intakte DNA mehr. Zellen in diesem Bereich werden als SubG1-Zellen bezeichnet und sind aufgrund der DNA-Fragmentierung bereits als apoptotisch anzusehen [102, 103].



**Abbildung 8 Histogramm der Zellzyklusanalyse**

Dargestellt ist die PI-Fluoreszenz gegen die Zellzahl sowie die unterschiedlichen Zellzyklusphasen.

Die Proben für die Zellzyklusanalyse wurden gemeinsam mit den Zelllysaten geerntet und dann aufgeteilt (s. 3.2.2.1). Der Anteil für die Analyse am Durchflusszytometer wurde erneut 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das verbliebene Zellpellet in 100  $\mu$ L PBS resuspendiert. Langsam tropfend wurde unter vortexen 2 mL  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltes Ethanol (80 %) zu den Zellen gegeben und diese so fixiert. Die fixierten Proben wurden maximal eine Woche bis zur Messung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Am Tag der Messung wurden die fixierten Zellen 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Die Zellpellets wurden in 333  $\mu$ L PBS und 1  $\mu$ L RNase resuspendiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden dann kurzzeitig auf Eis gelagert und am Durchflusszytometer FACSCanto™ II gemessen. Unmittelbar vor der Messung wurden 164  $\mu$ L des PI-Farbstoffes zugegeben. Die Auswertung erfolgte mittels Flowing Software gleichermaßen für alle Wiederholungen.

#### 3.2.4.2 Zelltodanalyse mittels Annexin V-FITC/PI Doppelfärbung

Für die Zelltodanalyse wurden die behandelten Zellen in 15 mL Falcons geerntet und dann 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellpellets in 1 mL PBS resuspendiert und in die FACS-Röhrchen überführt. In diesen wurden die Zellen erneut 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand wieder abgenommen. Die Pellets wurden mit 50  $\mu$ L des 1x Annexin-Bindepuffers resuspendiert und mit 2,5  $\mu$ L des Annexin V-FITC Farbstoffs für 15 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert.

Annexin V bindet spezifisch an Phosphatidylserin, welches bei intakter Membran an der Innenseite der Lipiddoppelschicht liegt und nicht von Annexin V gebunden werden kann. Während der Apoptose lagert sich das Phosphatidylserin jedoch an die Außenseite der Membran und wird dort von Annexin V gebunden. Bei nekrotischen Zellen ist die Membran permeabel für Annexin V. Annexin V bindet so innerhalb der nekrotischen Zellen an Phosphatidylserin. Somit markiert Annexin V apoptotische

und nekrotische Zellen. Vitale Zellen mit intakter Membran sind im Gegensatz dazu Annexin V negativ. Für die Differenzierung zwischen früher Apoptose und später Apoptose/Nekrose werden die Zellen nach der Inkubation mit Annexin V-FITC zusätzlich mit 5 µl PI gefärbt (430 µL Annexin-Bindepuffer + 10 µl PI). PI kann nur in nekrotische Zellen bzw. in Zellen der späten Apoptose eindringen und dort in die DNA interkalieren. Zellen mit vorhandener Membranintegrität sind PI negativ [104].

Die direkte Messung am Durchflusszytometer zeigt so die prozentualen Anteile der Population an:

1. lebende Zellen (Annexin V-FITC und PI negativ)
2. frühe Apoptose (Annexin V-FITC positiv, PI negativ)
3. späte Apoptose/Nekrose (Annexin V-FITC und PI positiv).

Die Auswertung erfolgt mit der BD FACSDIVA™ Software.

### 3.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit GraphPad Prism 6 und Microsoft Excel. Graphisch wurden die Ergebnisse mittels GraphPad Prism 6, Microsoft Excel oder Adobe Photoshop CC2018 dargestellt.

Die Anzahl der ausgewerteten Wiederholungen und die verwendete statistische Analyse wird für die jeweiligen Versuche entsprechend angegeben. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert <0,05 angenommen.

## 4 Ergebnisse

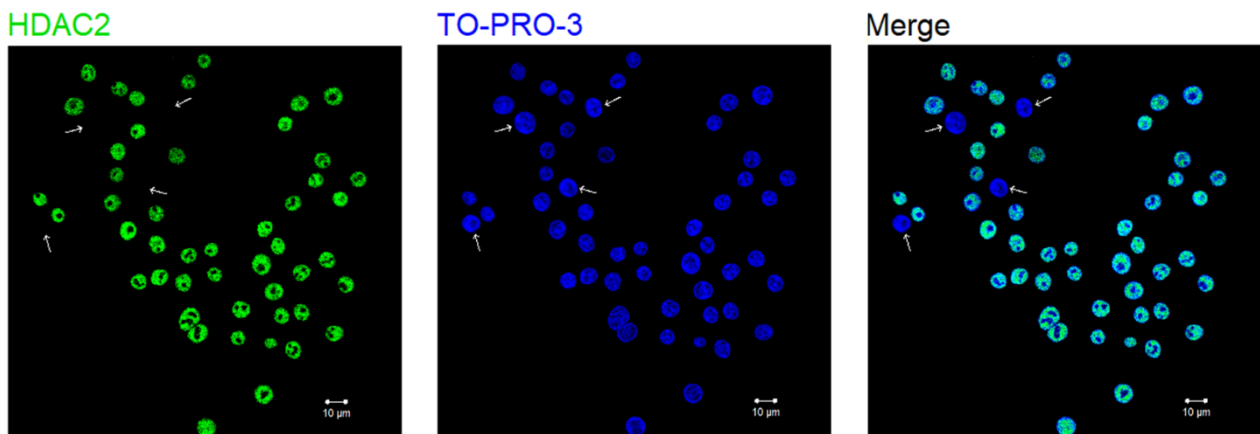
### 4.1 Untersuchung der Expression von HDAC2 in RKO-ATCC

RKO-ATCC Zellen, mit Herkunft aus der offiziellen ATCC® Zelldatenbank, gelten bislang als HDAC2 Wildtyp, das heißt die vorkommende Gensequenz für HDAC2 entspricht der normalerweise im Menschen vorliegenden Gensequenz.

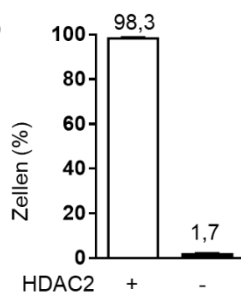
*Ropero et al.* verwendeten jedoch eine RKO Zelllinie mit Mutation in dieser Gensequenz, die dazu führt, dass HDAC2 nicht regelrecht translatiert wird. Die von *Ropero et al.* verwendete RKO-Zelllinie exprimiert HDAC2 demnach nicht, ist also negativ für HDAC2. Nachfolgende soll diese HDAC2-defiziente Zelllinie als RKO-ES bezeichnet werden.

Beide Zelllinien wurden jeweils sicher als RKO Zellen authentifiziert (Abb. A1/A2). Um diesen charakteristischen Unterschied der HDAC2 Expression in den ursprünglich identischen Zelllinien nachvollziehen zu können, untersuchten wir zunächst die Expression von HDAC2 innerhalb der RKO-ATCC Zelllinie.

#### A



#### B



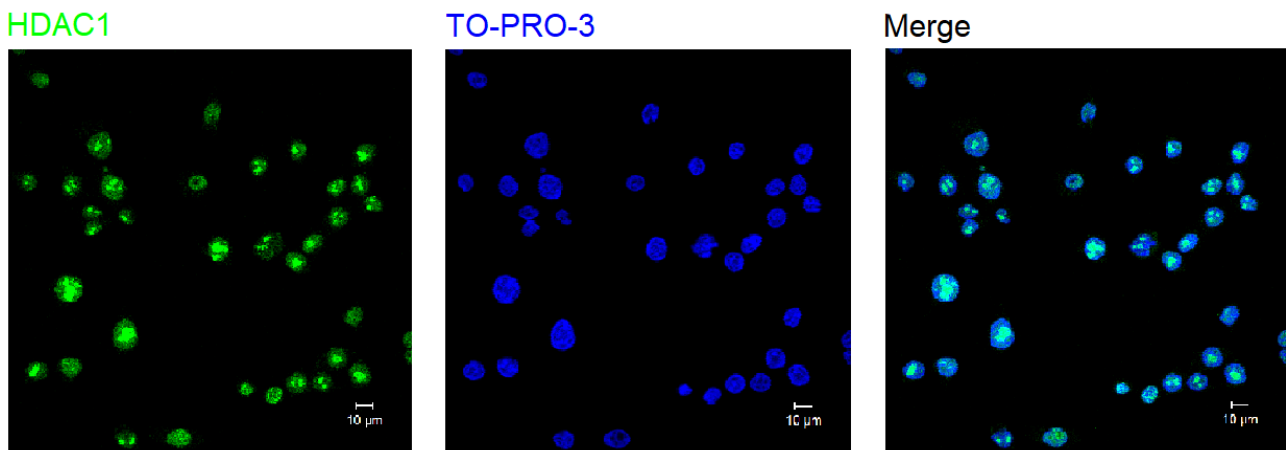
**Abbildung 9 Immunfluoreszenz von HDAC2 in der RKO-ATCC Zelllinie**

**A:** Repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen der immunhistochemischen Färbung von HDAC2, Kernfärbung mittels TO-PRO-3.

**B:** Prozentuale Verteilung von HDAC2 positiven und negativen Zellen (Ursprungsdaten Tab. A1). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Die RKO-ATCC Zellen wurden nach wenigen Wochen in der Erhaltungskultur mittels Immunfluoreszenz auf die Expression HDAC2 untersucht. HDAC2 wird vorwiegend im Zellkern exprimiert und sollte sich daher in der Immunfluoreszenz überwiegend im Zellkern anfärben lassen. Es zeigten jedoch nicht alle Zellen eine Färbung für HDAC2, die eine klare Kernfärbung zeigten (Abb. 9A). Dies deutet daraufhin, dass in diesen Zellen, trotz intakter Zellstrukturen, keine signifikante Expression von HDAC2 vorliegt. Die Immunfluoreszenz zeigt also, dass die RKO-ATCC eine Mischpopulation mit überwiegend HDAC2 positiven Zellen, durchschnittlich 98,3 %, und 1,7 % HDAC2 negativen Zellen, ist (Abb. 9B). Es wachsen also in der Kultur der RKO-ATCC Zelllinie parallel HDAC2 positive und HDAC2 negative Zellen.

Um zu verifizieren, ob sich dieser beobachtete Verlust der HDAC2 Expression in Einzelzellen auch für die zu HDAC2 komplementäre HDAC1 zeigen lässt, wurden die Zellen zudem mittels Immunfluoreszenz auf Heterogenität der HDAC1 untersucht (Abb. 10).



**Abbildung 10 Immunfluoreszenz von HDAC1 in der RKO-ATCC Zelllinie**

Repräsentative Bilder aus n = 3 unabhängigen Versuchen der immunhistochemischen Färbung von HDAC1, Kernfärbung mittels TO-PRO-3.

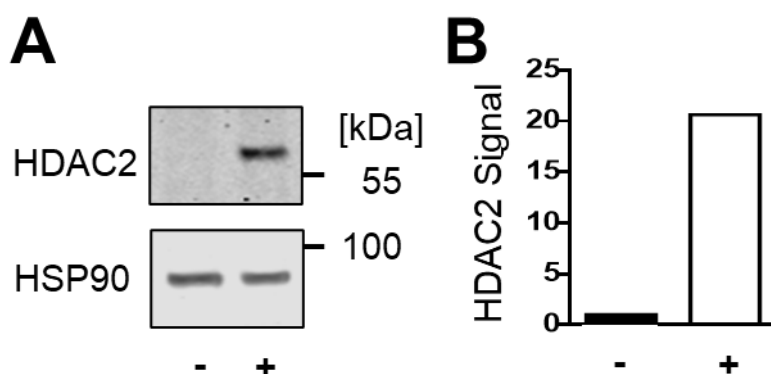
Die HDAC1 Färbung ist entgegen der HDAC2 Färbung in alle Zellen positiv, das heißt, dass HDAC1 in allen Zellen der RKO-ATCC Zelllinie exprimiert wird. Es gibt in den untersuchten RKO-ATCC Zellen somit keine HDAC1 negativen Zellen (Abb. 10).

## 4.2 Etablierung und Charakterisierung der verschiedenen RKO Zelllinien

### 4.2.1 Etablierung neuer Zelllinien durch Grenzzellverdünnung und Einzelzellselektion der RKO-ATCC Zelllinie

Da aus den Daten der Immunfluoreszenz bekannt war, dass in der RKO-ATCC Zelllinie sowohl HDAC2 positive als auch HDAC2 negative Zellen gemeinsam vorliegen (Abb. 9), war es im Folgenden das Ziel, diese beiden Subpopulationen aus der gemeinsamen Kultur zu trennen und separat zu kultivieren. So sollten Zelllinien generiert werden, die entweder homogen HDAC2 exprimieren oder vollständig defizient für die HDAC2 Expression sind.

Mittels Grenzzellverdünnung (s. 3.2.1.2), bei der durch klonales Wachstum neue Zellklone aus einer einzelnen Mutterzelle heranwachsen, wurden neue Zelllinien aus der RKO-ATCC Zelllinie heraus generiert. Die HDAC2 Expression innerhalb dieser aus Einzelzellklonen entstandenen Zelllinie wurde anschließend in der Western Blot Analyse bestimmt (Abb. 11/ A3).



**Abbildung 11 Bestimmung des HDAC2 Status der Einzelzellklone**

**A:** Repräsentative Western Blot Analyse eines ausgewählten HDAC2-positiven (+) RKO Zellklons (Nr. 5), und eines HDAC2-negativen (-) Zellklons (Nr. 4), von insgesamt 17 getesteten Einzelzellklonen für HDAC2 und HSP90. Molekulargewicht in kDa. Die dargestellten Zellklone wurden später als Zelllinien etabliert und für alle weiteren Versuche verwendet. Für eine vollständige Darstellung der Western Blot Membran für alle Zellklone s. Abb. A3/A4

**B:** Analyse des Signals von HDAC2 normalisiert zur Ladungskontrolle von HSP90. Das Signal des negativen Zellklons Nr. 4 wurde zur besseren Vergleichbarkeit mit 1 gleichgesetzt.

Es konnten mit dieser Methode insgesamt 17 Zellklone gewonnen werden, die zur Analyse der HDAC2 Expression zur Verfügung standen. 16 dieser Klone zeigten dabei deutliche Proteinbanden für HDAC2 und die Ladekontrolle HSP90. Der verbliebene 17. Zellklon (Nr. 4) hingegen zeigte in der Western Blot Analyse keine Proteinbande für HDAC2 bei eindeutiger Proteinbeladung mit positiver HSP90 Ladekontrolle. Für diesen negativen Klon zeigte sich auch in der Auswertung der Signalintensitäten kein Signal von HDAC2 (Abb. 11).

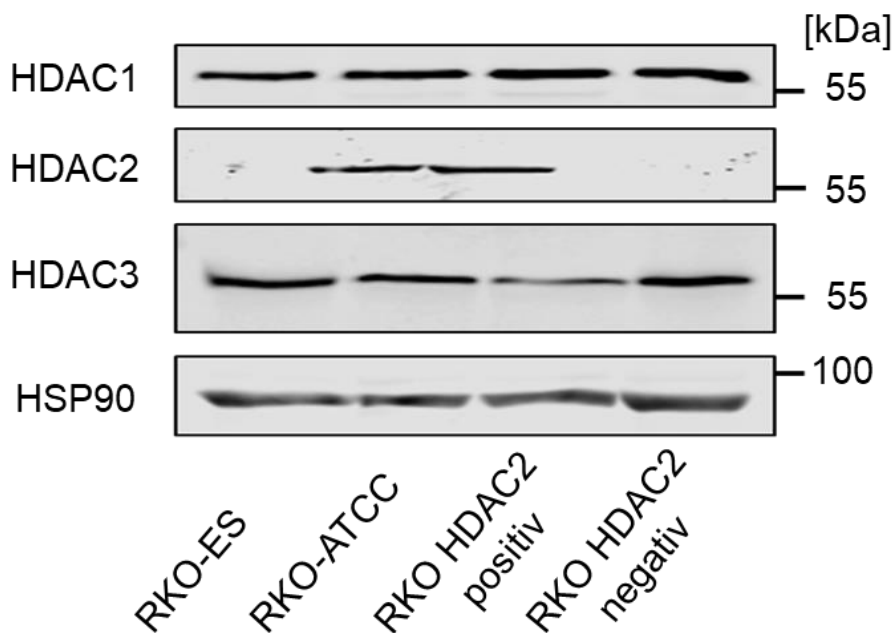


Mithilfe dieser Ergebnisse konnten zwei neue Zelllinien etabliert werden, die sich hinsichtlich ihres Proteingehalts von HDAC2 unterscheiden. Aus dem Einzelzellklon Nr. 5 (+) mit eindeutigem HDAC2 Signal wurde die neue Zelllinie RKO HDAC2 positiv. Der Einzelzellklon Nr. 4 (-) ohne HDAC2 Bande wurde dementsprechend zur Zelllinie RKO HDAC2 negativ. Für die weiteren Versuche standen nun vier RKO Zelllinien: RKO-ES, RKO-ATCC, RKO HDAC2 positiv und RKO HDAC2 negativ zur Verfügung.

Da die Klasse I HDACs in verschiedenen Prozessen synergistisch agieren, stand nun die Frage im Vordergrund, ob der HDAC2 Status Einfluss auf die Expression der anderen HDACs nimmt. So wurden neben HDAC2 auch HDAC1 und HDAC3 mittels Western Blot Analyse in allen vier RKO Zelllinien untersucht.

### 4.2.2 Charakterisierung der HDAC2 Proteinexpression in RKO Zelllinien

Die Western Blot Analyse zeigte bereits klare Unterschiede zwischen den vier RKO Zelllinien.



**Abbildung 12 Proteinexpression verschiedener HDACs**

Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen.

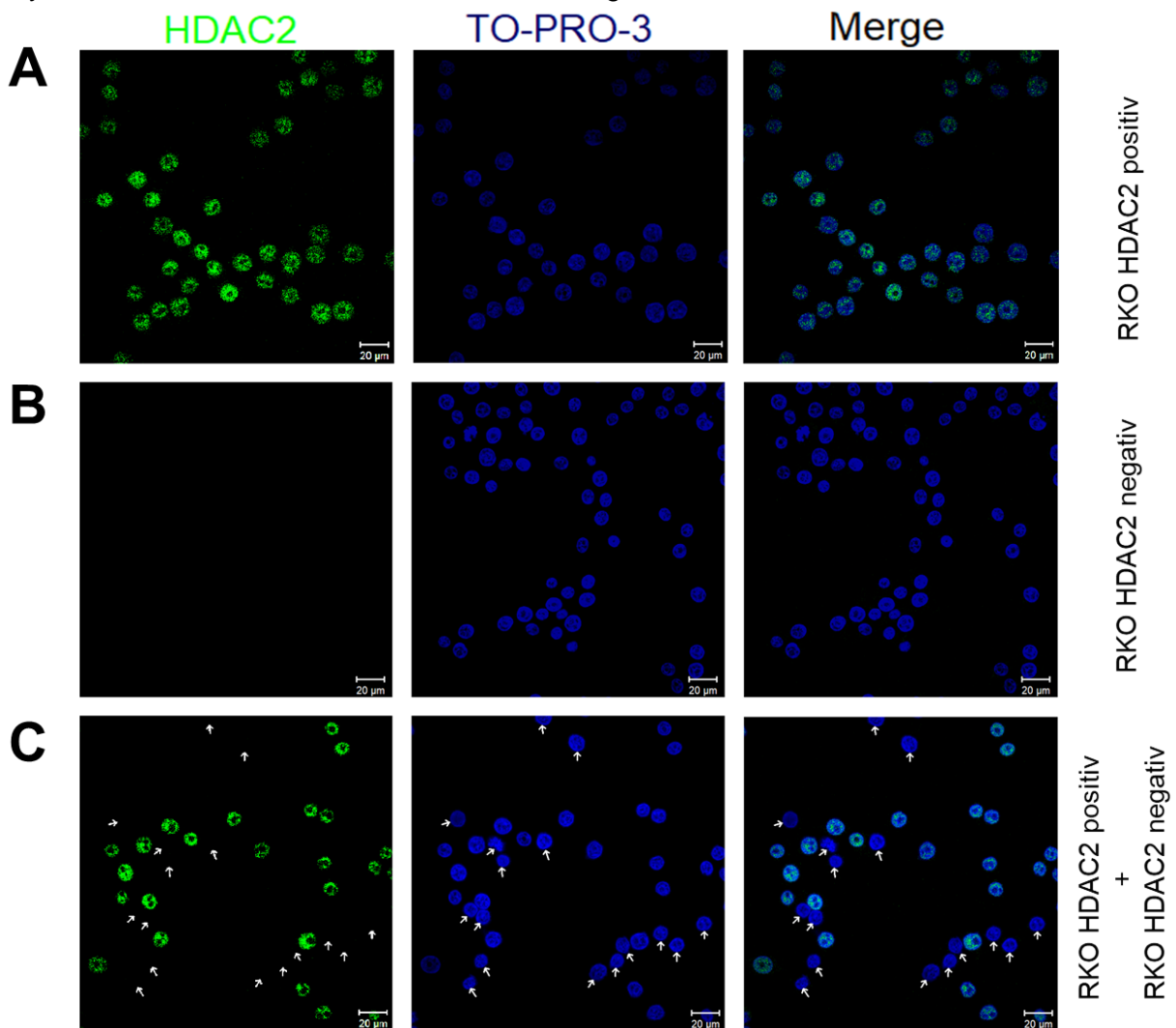
Western Blot Analyse von HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HSP90 der Zelllinien RKO-ES, RKO-ATCC, RKO HDAC2 positiv und RKO HDAC2 negativ. Molekulargewicht in kDa. Für den vollständigen Western Blot s. Abb. A5.

Die Analyse der Proteinexpression von HDAC2 zeigt in den vier verglichenen Zelllinien, dass nur in RKO-ATCC und RKO HDAC2 positiven Zellen eine Proteinbande für HDAC2 detektierbar ist. In RKO-ES und RKO HDAC2 negativen Zellen hingegen ist keine HDAC2 Proteinbande darstellbar.

Dahingegen werden die Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC3 in allen vier Zelllinien exprimiert. Es gibt dabei keine wesentlichen quantitativen Unterschiede hinsichtlich der Proteinexpression von HDAC1 und HDAC3 innerhalb der vier verschiedenen Zelllinien (Abb. 12). Die beiden

Strukturproteine VIMENTIN und  $\beta$ -CATENIN, wichtig zur Differenzierung zwischen epithelialer oder mesenchymaler Herkunft der Zellen, werden ebenfalls in allen vier Zelllinien gleichmäßig exprimiert (Abb. A5).

Die Western Blot Analyse liefert nur qualitative Informationen über die exprimierte Proteinmenge und kann quantitativ nur globale Unterschiede in der Proteinmenge der analysierten Zellpopulation auflösen. Die Methode ist damit nur bedingt geeignet, um eine Mischpopulation aus einzelnen Zellen mit abweichender HDAC2 Expression zu identifizieren. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob es in den Zelllinien RKO HDAC2 positiv und RKO HDAC2 negativ, wie in ihrer Mutterzelllinie RKO-ATCC, auch einzelne Zellen mit diskrepanter Expression von HDAC2 gibt, wurde die genauere Analyse mittels indirekter Immunfluoreszenz durchgeführt.



**Abbildung 13 Immunfluoreszenz von HDAC2 in den Zelllinien RKO HDAC2 positiv und RKO HDAC2 negativ**  
Die Abbildung zeigt repräsentativ ausgewählte Bilder von zwei unabhängigen Versuchen. Es wurden jeweils 300.000 Zellen/ Deckglas ausgesät. Der Messbalken entspricht 20  $\mu$ m.

**A:** Immunhistochemische Färbung von HDAC2 und Kernfärbung mit TO-PRO-3 in RKO HDAC2 positiven Zellen.

**B:** Immunhistochemische Färbung von HDAC2 und Kernfärbung mit TO-PRO-3 in RKO HDAC2 negativen Zellen.

**C:** Immunhistochemische Färbung von HDAC2 und Kernfärbung mit TO-PRO-3 in einer gemischten Aussaat von RKO HDAC2 positiven und RKO HDAC2 negativen Zellen. Es wurden jeweils 150.000 Zellen der beiden Linien gemeinsam für den Versuch ausgesät. Die weißen Pfeile markieren Zellen, die keine HDAC2 Färbung bei klarer Kernfärbung zeigen.

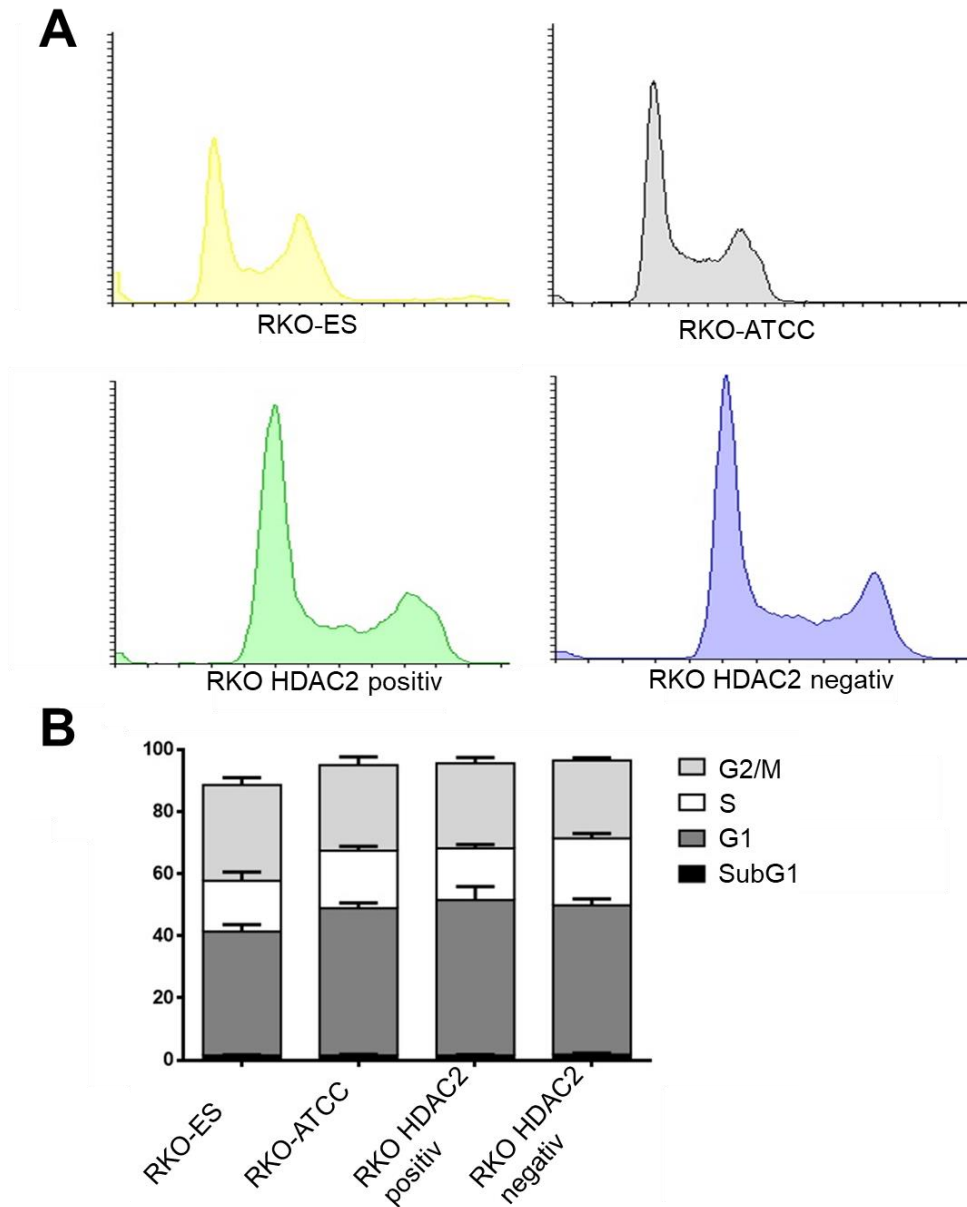
Alle Zellen der Zelllinie RKO HDAC2 positiv zeigten in der Immunfluoreszenz ein deutliches Signal für die HDAC2 Färbung bei intakter Zellkernfärbung mit TO-PRO-3 (Abb. 13A). Es gibt in dieser Zelllinie im Gegensatz zur Mutterzelllinie RKO-ATCC keine negativen Einzel-Zellen in der immunhistochemischen Färbung von HDAC2. Damit exprimieren alle Zellen der neu etablierten Zelllinie RKO HDAC2 positiv das Protein HDAC2.

Die Immunfluoreszenz der RKO HDAC2 negativen Zellen zeigt kein Signal für HDAC2, während sich die Kernfärbung mittels TO-PRO-3 klar darstellt. Es gibt also keine Expression von HDAC2 in den RKO HDAC2 negativen Zellen mit intakter DNA.

Da es kaum möglich ist eine tatsächlich negative Färbung durch fehlende Proteinexpression von einer negativen Färbung durch Fehler im Versuchsablauf zu unterscheiden, wurde in einem weiteren Versuch eine Kultur bestehend aus 50 % RKO HDAC2 positiven und 50 % RKO HDAC2 negativen Zellen gemeinsam auf ein Deckglas ausgesät (Abb. 13C). Ausnahmslos alle Zellen ließen sich mit dem Kernfarbstoff TO-PRO-3 anfärben. Ein HDAC2 Signal ist hingegen nur in rund der Hälfte der Zellen nachweisbar. In beiden unabhängig durchgeführten Versuchen sind die Zellen der Mischpopulation jeweils zu rund der Hälfte positiv für HDAC2 und zu rund der anderen Hälfte negativ für HDAC2, wobei die in Abb. 13C mit Pfeil markierten Zellen keine Expression von HDAC2 zeigen. Dies bestätigt, dass die Zelllinie RKO HDAC2 negativ kein HDAC2 Protein exprimiert.

### 4.2.3 Wachstumsverhalten und Morphologie der Zelllinien

Die vier verschiedenen RKO Zelllinien wurden parallel in der Zellkultur unter den oben genannten Bedingungen kultiviert (s. 3.2.1.1). Während der gesamten Durchführung der experimentellen Arbeit zeigten alle Zellreihen dabei sehr ähnliche Wachstumsgeschwindigkeiten. Auch während einzelner Versuche waren bei der mikroskopischen Betrachtung der Zellen keine wesentlichen Unterschiede bezüglich Zelldichte und Zellmorphologie erkennbar. Für den genaueren Vergleich des Wachstumsverhaltens der Zelllinien wurde die Zellzyklusverteilung unbehandelter Proben der jeweiligen Zelllinien im Durchflusszytometer analysiert und statistisch ausgewertet.



**Abbildung 14 Zellzyklus unbehandelter Zellen**

Zellzyklusanalyse der unbehandelten Zellen. Die unbehandelten Zellen wurden mit Ethanol fixiert, mit PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert (s. 3.2.4).

**A:** Abgebildet sind repräsentativ ausgewählte Histogramme der Zellzyklusanalyse der Zelllinien RKO-ES (gelb), RKO-ATCC (schwarz), RKO HDAC2 positiv (grün) und RKO HDAC2 negativ (blau)

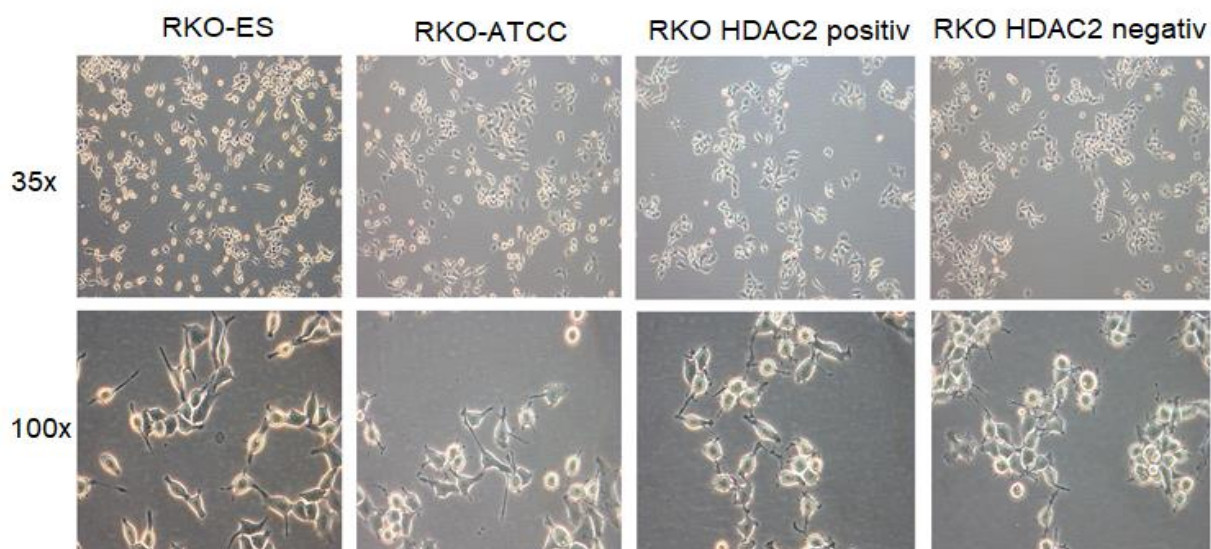
**B:** Anteil der verschiedenen Zellzyklusphasen in unbehandelten Zellpopulation aller vier Zelllinien. Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz wurde mittels multifaktorieller Anova und dem Post-hoc Test nach Tukey berechnet. Gesamtdatenmenge mit statistischer Auswertung im Anhang (Tab. A2).

Die Darstellungen des Zellzyklus zeigt für alle Zellreihen eine physiologische Verteilung wie erwartbar in vitalen, sich teilenden Zellen. In allen Messungen von Proben der verschiedenen Zelllinien zeigt sich ein erster deutlicher Peak bei niedrigen PI-Intensitäten. Dieser Peak entspricht der Interkalation des Farbstoffes PI in Zellen mit einfacher DNA-Menge, also Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Daneben schließt sich bei höherer Farbstoffintensität der Zellanteil der analysierten Proben an, der sich in der S-Phase des Zellzyklus befindet. Da innerhalb dieser Zellzyklusphase der

DNA-Gehalt der Zellen zunimmt, können größere Mengen an PI in den Zellen eingelagert werden. Ein zweiter, prominenter Peak bei doppelter PI Intensität, verglichen zur Intensität des G1-Peaks, stellt die G2-Phase bzw. Mitosephase dar. Dieser Peak zeigt den Zellanteil der Gesamtpopulation, deren DNA-Gehalt sich nach durchlaufen der S-Phase vollständig verdoppelt hat.

Es fällt auf, dass sich signifikant ( $p < 0,01$ ) weniger Zellen der RKO-ES Zelllinie in der G1-Phase befinden als in den anderen 3 Zelllinien (Tab. A2). Für alle anderen Zellzyklusphasen zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede innerhalb der unterschiedlichen RKO Zelllinien (Tab. A2). Die Zellanteile in SubG1 sowie der S- bzw. G2/M-Phasen zwischen den vier Zelllinien zeigen keine statistisch signifikanten Unterschiede, sondern resultieren auf physiologischen Schwankungen durch den dynamischen Wechsel der Zellzyklusphasen wachsender, sich teilenden Zellen

Die angefertigten Aufnahmen mittels Hellfeldmikroskop ermöglichen einen direkten Vergleich zwischen der Morphologie der vier verschiedenen Zelllinien.



**Abbildung 15 Hellfeldmikroskopische Darstellung der verschiedenen RKO Zelllinien**

Die Abbildung zeigt repräsentativ ausgewählte Aufnahmen der unbehandelten RKO Zellen. Aufgenommen wurden diese am Hellfeldmikroskop direkt aus Zellkulturflaschen. Die oberen Aufnahmen zeigen eine 35-fache Vergrößerung (35x), die unteren eine 100-fache Vergrößerung (100x).

In der Übersichtsaufnahme (35-fache Vergrößerung) sieht man, dass alle Zelllinien zum Zeitpunkt der Aufnahme eine vergleichbare Zelldichte aufweisen. Alle Zelllinien wachsen sowohl vereinzelt wie auch in kleineren Zellverbänden. Je nach Anschnitt der Zellen zeigen sich in allen vier Zelllinien vergleichbare Aufhellungen, die besonders stark bei abgerundeten Zellen zu sehen sind und auf das dreidimensionale Wachstum der Zellen zurückzuführen ist. Orientierend scheinen die vier Zelllinien dementsprechend in allen 3 Raumachsen vergleichbare Zellverbände zu bilden.

In der höheren Vergrößerung erkennt man, dass alle vier RKO Zelllinien einen annähernd rechteckigen Zellkörper besitzen und von dem längliche Zellfortsätze eine Verbindung zu den

benachbarten Zellen bilden. Diese Zellkontakte und Verknüpfungen sind sowohl bei den beiden HDAC2 positiven wie auch den beiden HDAC2 defizienten Zelllinien vorhanden.

### 4.3 *In vitro* Ansprechen der RKO Zelllinien auf unterschiedliche medikamentöse Behandlungen

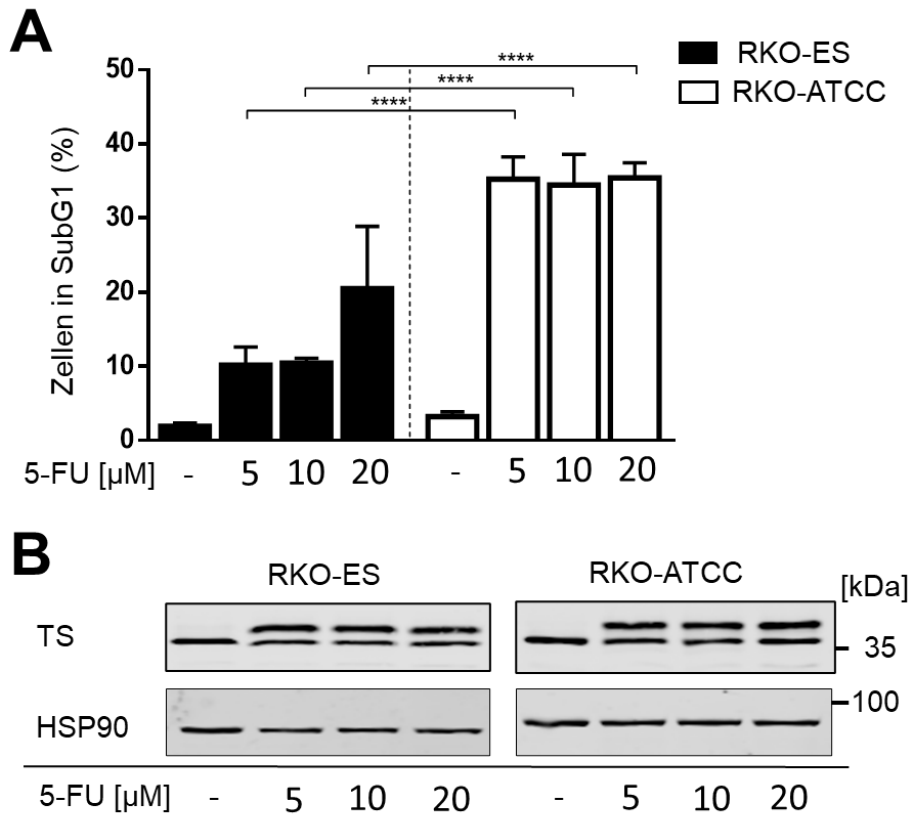
Um den Einfluss der unterschiedlichen HDAC2 Expression in einen klinisch relevanten Bezug setzen zu können, wurden die verschiedenen Zelllinien im Rahmen dieser Arbeit mit den traditionell bewährten Chemotherapeutika 5-FU und OX behandelt.

Es ist bekannt, dass es klinisch immer wieder einzelne Tumore gibt, die sich im Therapieansprechen deutlich von der Mehrheit gleicher Karzinome unterscheiden. Daher soll im Folgenden untersucht werden, ob der HDAC2 Status solcher Tumore Relevanz für das Therapieansprechen solcher Tumore haben kann.

#### 4.3.1 Dosisfindung des Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil in RKO-ES und RKO-ATCC Zellen

Vorversuche mit den beiden bereits etablierten Zelllinien RKO-ES und RKO-ATCC wurden durchgeführt, um eine optimale Dosis von 5-FU in den RKO Zelllinien zu finden.

Die optimale Dosis des Zytostatikums führt zu einer ausreichenden Zytotoxizität, um etwaige Unterschiede im Therapieansprechen zwischen den beiden Zelllinien zu detektieren. Und muss dabei möglichst niedrig gewählt werden, sodass die Dosis für nachfolgende Untersuchungen außerhalb der Zellkultur möglichst wenige unerwünschte Nebenwirkungen mit sich bringt.



**Abbildung 16 Behandlung der RKO-ES und RKO-ATCC Zellen mit 5-FU zur Dosisfindung**

**A:** Dargestellt sind Mittelwerte +/- SD von drei unabhängigen Versuchen des SubG1 Anteils 48 h nach Behandlung mit 5-FU. Die beiden Zelllinien RKO-ES und RKO-ATCC wurden jeweils mit 5-FU in den Konzentrationen 5 µM, 10 µM und 20 µM behandelt. Die Varianz wurde mittels einfaktorieller ANOVA und dem Post Hoc Test nach Tukey berechnet;

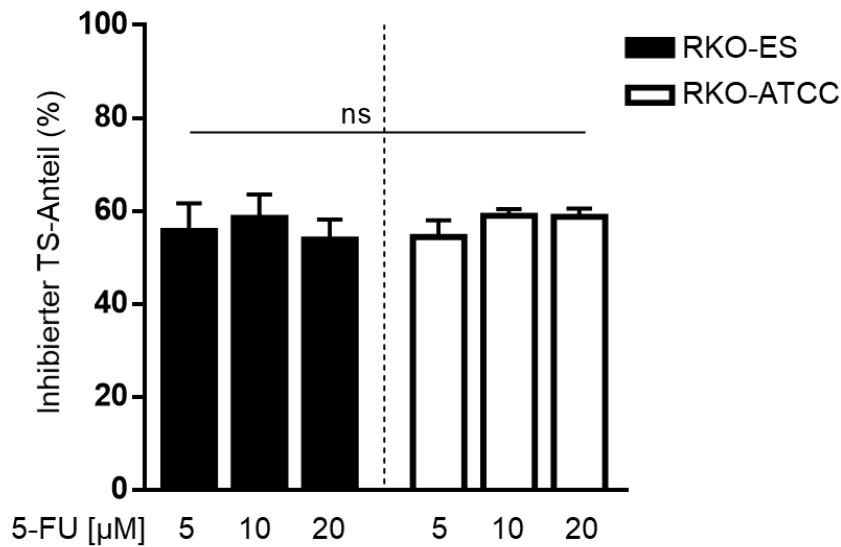
\*\*\*\* =  $p < 0,0001$ . Für die vollständige statistische Auswertung s. Tabelle A3.

**B:** Repräsentativ ausgewählte Western Blot Analyse der Proteine Thymidylatsynthase (TS) und HSP90 48 h nach Behandlung mit 5-FU. Molekulargewicht in kDa.

Die unbehandelten Kontrollen der beiden Zelllinien zeigen eine vergleichbare Zelltodrate ohne signifikanten Unterschied. Der SubG1-Anteil liegt bei weniger als 5 % (Tab. A3). Nach Behandlung mit dem Chemotherapeutikum 5-FU lässt sich ein signifikanter Unterschied in der Zelltodinduktion zwischen den beiden getesteten Zelllinien erkennen (Abb. 16). Der Anteil der RKO-ES Zellen in SubG1 ist für alle Konzentrationen (5 µM, 10 µM und 20 µM) von 5-FU signifikant geringer als der SubG1-Anteil der RKO-ATCC Zellen (Abb. 16/ Tab. A3).

Zur Kontrolle einer effizienten und spezifischen Inhibition von Thymidylatsynthase (TS) durch die gewählten 5-FU-Konzentrationen wurden aus allen Proben zusätzlich Proteinlysate gewonnen und diese in der Western Blot Analyse hinsichtlich der TS Expression untersucht. 5-FU bindet an TS und bildet einen stabilen Komplex mit dem Enzym [49]. Dieser Komplex zeigt in der Gelelektrophorese verglichen mit dem ungebundenen Enzym TS ein verändertes Migrationsverhalten. Dadurch ergibt sich in den behandelten Zellen eine zweite Bande in der Western Blot Analyse, durch die auf den Anteil an inhibiertem Enzym geschlossen werden kann.





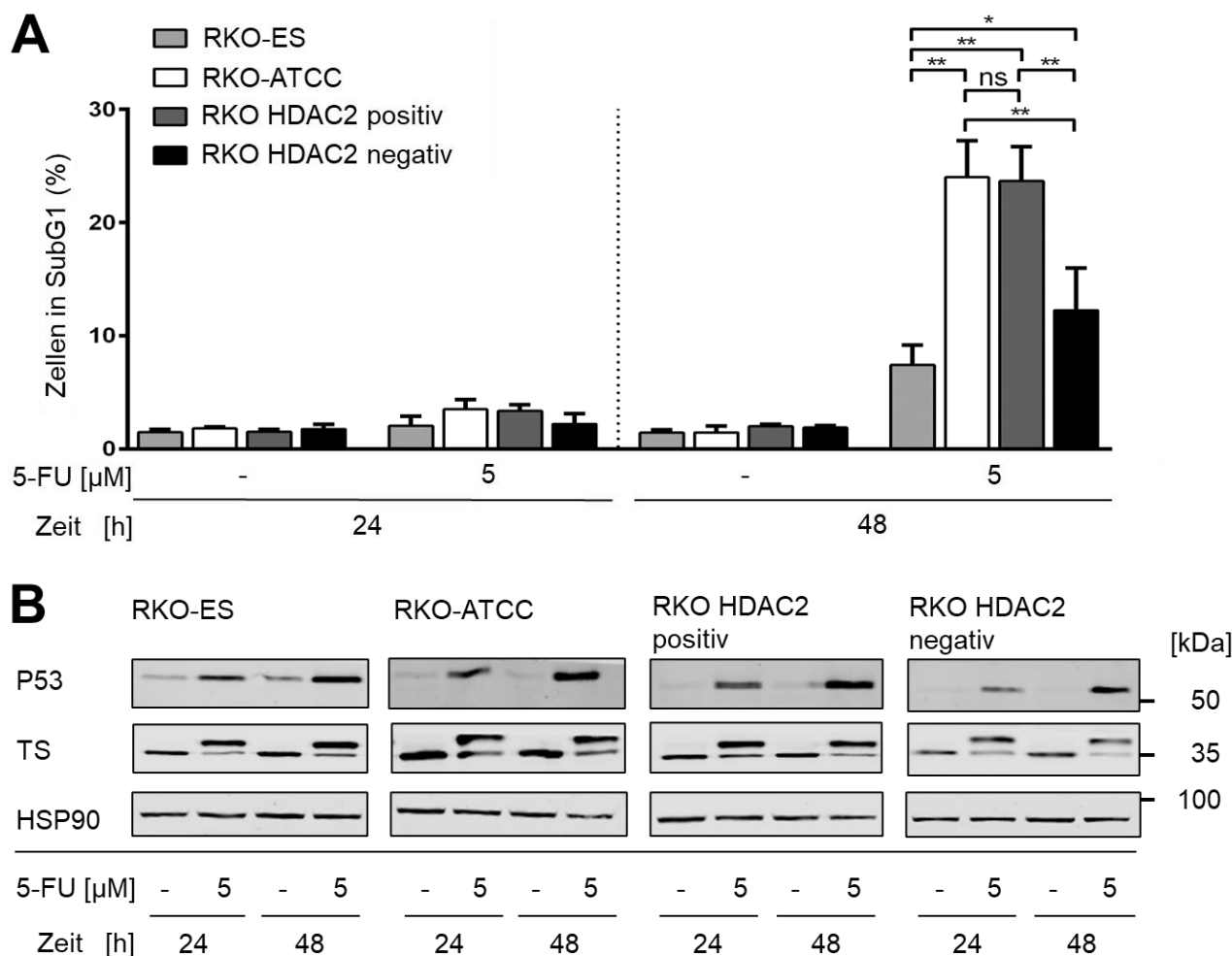
**Abbildung 17 Durch Komplexbindung mit 5-FU inhibierter TS-Anteil**

Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil des Proteins TS, der durch die Behandlung mit 5-FU eine Komplexbindung mit 5-FU eingeht und so inhibiert wird. Der Proteinanteil bezieht sich auf das zur Ladekontrolle HSP90 normierte Signal von TS in der Western Blot Analyse. Das inhibierte TS-Protein entspricht der oberen Proteinbande in Abb. 16. Dargestellt sind Mittelwerte mit SD aus drei unabhängigen Versuchen, die exakten Werte sind in Tab. A4 dargestellt.

Die getrennte Analyse der beiden Proteinbanden der TS, also den inhibierten, an 5-FU gebundenen Anteil und den freien, aktiven Enzymanteil, zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen von 5-FU oder zwischen den beiden Zelllinien RKO-ATCC und RKO-ES (Abb. 17/Tab. A4).

Aus den Ergebnissen dieser Konzentrationsreihe ergibt sich, dass eine Konzentration von 5 µM 5-FU ausreichend ist, um in der Zellzyklusanalyse signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen RKO-Zelllinien zu detektieren und gleichzeitig zu einer effizienten und vergleichbaren Inhibierung der TS-Aktivität führt. Da bereits die niedrige Konzentration ausreichend signifikante Unterschiede im Therapieansprechen hervorruft, bieten die höheren Konzentrationen keinen statistischen Vorteil. Zudem ist aus klinisch medizinischer Sicht eine möglichst niedrige und dennoch wirksame Dosierung zu präferieren, um unerwünschte toxische Effekte zu minimieren.

### 4.3.2 Sensitivität der RKO Zelllinien für die Behandlung mit 5-FU



**Abbildung 18 Die Behandlung von RKO Zellen mit 5 µM 5-FU induziert signifikant unterschiedlich den Zelltod**

**A:** Mittelwert +/- SD des Anteils der Zellen in SubG1 nach Behandlung der Zelllinien RKO-ES, RKO-ATCC, RKO HDAC2 positiv und RKO HDAC2 negativ mit 5 µM 5-FU für 24 und 48 h sowie der zugehörigen Kontrollen aus drei unabhängigen Versuchen. Die Varianz wurde mittels einfaktorieller ANOVA und Post Hoc Test nach Tukey berechnet; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant. Für die vollständige statistische Auswertung s. Tabelle A4.

**B:** Repräsentative Darstellung der Western Blot Analyse für die Expression der Proteine P53, TS und HSP90 in den vier verschiedenen RKO Zelllinien. Dargestellt sind die beiden Endpunkte 24 h und 48 h jeweils für die unbehandelten Kontrollen und die Zellen nach Behandlung mit 5 µM 5-FU. Molekulargewicht in kDa.

In der Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit dem Chemotherapeutikum 5-FU zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien. In allen vier Zelllinien lässt sich nach 24 h ein leicht erhöhter, jedoch nicht statistisch signifikanter, Anteil an Zellen in SubG1 vergleichen zur unbehandelten Kontrolle darstellen (Abb. 18A/Tab. A5).

Am zweiten Endpunkt nach weiteren 24 h, also einer Gesamtbehandlungsdauer von 48 h, ist der SubG1 Anteil, als Marker für den Prozentsatz an Zellen mit eingeleitetem Zelltod an der Gesamtpopulation, in allen vier Zelllinien deutlich angestiegen. Der SubG1-Anteil aller mit 5-FU behandelten Zellen unterscheidet sich nach 48 h Behandlungsdauer statistisch signifikant von der zugehörigen, unbehandelten Kontrolle (Abb. 18A/Tab. A5). Somit lässt sich die Wirksamkeit von 5-FU in allen vier Zelllinien klar erkennen. Dabei reagieren Zelllinien, die eine Expression von HDAC2

zeigen (RKO-ATCC und RKO HDAC2 positiv) mit erhöhter Toxizität auf die gleiche Dosis des Therapeutikums 5-FU (Abb. 18A).

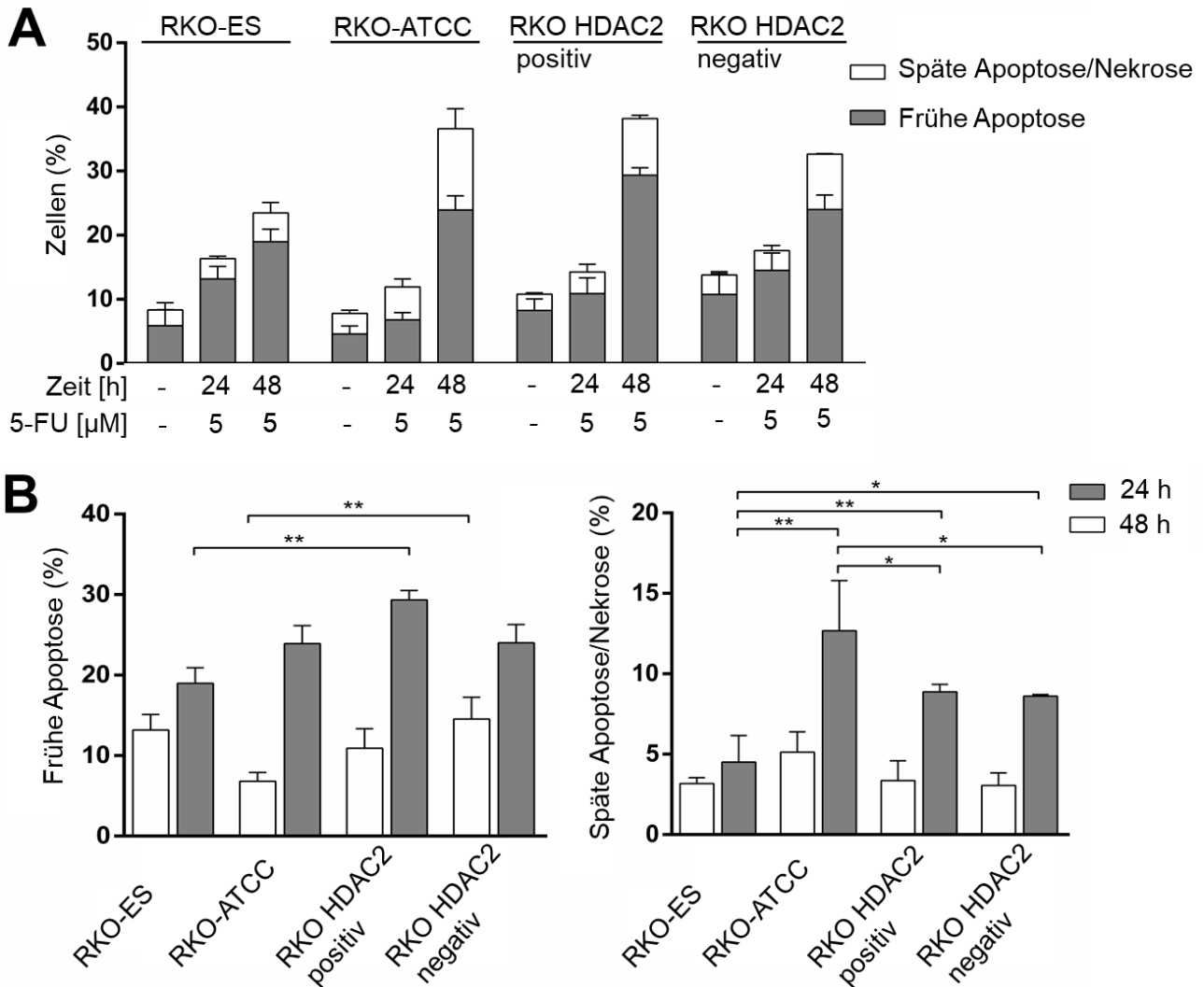
Unter den 48 h mit 5-FU behandelten Zellen zeigt die RKO-ES Zelllinie mit 7,45 % den geringsten SubG1-Anteil. In zunehmender Reihenfolge schließen sich die RKO HDAC2 negativen Zellen (SubG1 Anteil 12,26%) gefolgt von den RKO HDAC2 positiven (SubG1-Anteil 23,68%) und anschließend den RKO-ATCC Zellen mit dem höchsten prozentualen Zellanteil in SubG1 von 24,02 % an. Die therapeutischen Effekte von 5-FU sind also in den RKO-ATCC Zellen am stärksten und in den RKO-ES Zellen am geringsten (Abb. 18A).

Statistisch signifikant unterscheidet sich dabei der SubG1-Anteil der Zelllinie RKO-ES von den Anteilen der anderen drei untersuchten Zelllinien sowie der SubG1-Anteil der RKO HDAC2 negativen Zellen von den RKO HDAC2 positiven und den RKO-ATCC Zellen. Der SubG1 Anteil der neu etablierten Zelllinie RKO HDAC2 positiv und der Mutterzelllinie RKO-ATCC unterscheidet sich hingegen nicht statistisch signifikant (Abb. 18A/Tab. A5).

In der Western Blot Analyse zeigen sich für das Protein TS zwei Banden als Nachweis der effizienten Komplexbildung von 5-FU und dem Enzym TS. Damit ist auch hier der indirekte Nachweis einer Inhibierung der Enzymaktivität in allen Zelllinien gegeben (Abb. 18B). Das Protein P53, welches als Marker für Zelltod angesehen werden kann, zeigt in den behandelten Zellen eine deutliche stärkere Proteinexpression im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Qualitativ scheint es dabei in der Expression von P53 keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien zu geben (Abb. 18B).

Da die bisherige Zelltodanalyse allein nur Aufschluss über den Anteil an Zellen mit verringertem DNA-Gehalt (SubG1) und somit nur bedingt Aufschluss über den Anteil, der sich tatsächlich in Apoptose befindenden Zellen gibt, wurde eine weitere durchflusszytometrische Analyse mittels Annexin V/PI Färbung nicht fixierter Zellen durchgeführt.

Diese Doppelfärbung von Annexin V und PI nicht fixierter Zellen erlaubt eine Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose bzw. unterschiedlichen Zeitpunkten der Apoptose. Annexin V bindet an das Lipid Phosphatidylserin, welches auf der Außenseite der Zellmembran von früh apoptotischen Zellen präsentiert wird. Durch an Annexin V gebundenes FITC können so spezifisch Zellen in der frühen Phase der Apoptose detektiert werden. Kommt es bei weiter fortgeschrittenem Zelltod zur Porosität der Zellmembran, kann PI in die Zellen eindringen und diese spät apoptotischen/nekrotischen Zellen zudem anfärbt. Diese Zelltodanalyse gibt also Hinweise auf die Art des Zelltods in den behandelten Zellen.



**Abbildung 19** Zelltodanalyse mittels Durchflusszytometrie der RKO Zellen nach Behandlung mit 5-FU

Für die Zelltodanalyse wurden die Zellen 24 h bzw. 48 h mit 5  $\mu$ M 5-FU behandelt und für die Messung am Durchflusszytometer mit Annexin/PI gefärbt. Für die vollständige statistische Auswertung s. Tabelle A5.

**A:** Mittelwerte +/- SD der verschiedenen Zelltodphasen für behandelte und unbehandelte Zellen aus drei unabhängigen Versuchen.

**B:** Getrennte Darstellung der Mittelwerte +/- SD von früher Apoptose sowie später Apoptose/Nekrose für alle 4 Zelllinien. Die Varianz wurde mittels einfaktorieller ANOVA und Post Hoc Test nach Tukey, \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$

Die Behandlung mit 5-FU induziert in allen vier RKO Zelllinien sowohl frühe Apoptose als auch späte Apoptose/Nekrose (Abb. 19). Nach 24-stündiger Behandlung ist in allen 4 Zelllinien lediglich ein leichter Zellanteil apoptotischer/nekrotischer Zellen zu verzeichnen, der mit etwas weniger als 20 % in der RKO-ES Zelllinie am stärksten ausgeprägt ist (Abb. 19A).

Tendenziell ist der Anteil der frühen Apoptose nach 24 h in den RKO-ES und RKO HDAC2 negativen Zellen am größten. Statistisch signifikant unterscheidet sich jedoch nur der Anteil der RKO-ATCC Zellen von den RKO HDAC2 negativen Zellen (Abb. 19B).

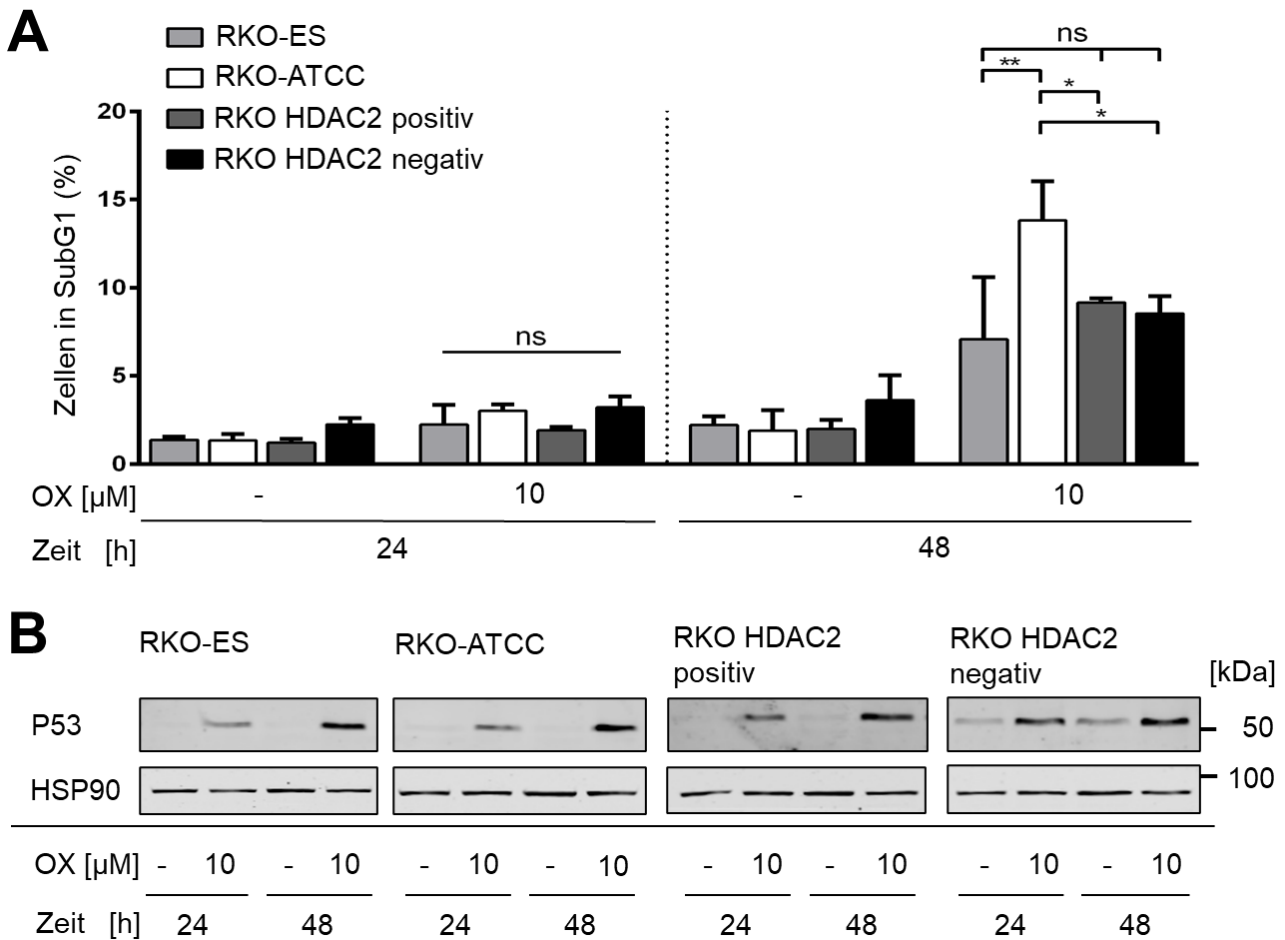
Nach einer Gesamtbehandlungsdauer von 48 h befindet sich in allen Zelllinien ein deutlich größerer Anteil der Zellen in früher oder später Apoptose bzw. Nekrose. In den beiden Zelllinien RKO-ATCC

und RKO HDAC 2 positiv befinden sich prozentual am meisten Zellen in einer der beiden Zelltodfraktionen (Abb. 19A).

Die RKO-ES Zellen zeigten nach 48-stündiger Behandlung mit 5-FU einen statistisch signifikant geringeren Zellanteil in der frühen Apoptose als die RKO HDAC2 positive Zelllinie. (Abb. 19B). Die RKO-ES Zelllinie nach 48 h mit circa 5 % spät apoptotischer/nekrotischer Zellen den geringsten Zellanteil und unterscheidet sich damit statistisch signifikant von den anderen drei Zelllinien. Mit etwas mehr als 10 % der Zellen in später Apoptose oder Nekrose zeigt die RKO-ATCC Zelllinie den größten Zellanteil in dieser Fraktion und unterscheidet sich statistisch signifikant von den beiden Zelllinien RKO HDAC2 positiv und negativ (Abb. 19B).

### 4.3.3 Sensitivität der RKO Zelllinien für die Behandlung mit Oxaliplatin

Neben 5-FU ist OX ein weiteres, klinisch etabliertes Zytostatikum in der Behandlung der kolorektalen Malignome. Um den Einfluss der unterschiedlichen HDAC2 Expression der analysierten RKO Zelllinien auf die Behandlung mit OX zu untersuchen, wurde zunächst wiederum eine Zellzyklusanalyse durchgeführt.



**Abbildung 20 Die Behandlung von RKO Zellen mit 10 µM Oxaliplatin induziert den Zelltod**

**A:** Mittelwerte  $\pm$  SD des SubG1-Anteils 24 und 48 h nach Behandlung der Zelllinien RKO-ES, RKO-ATCC, RKO HDAC2 positiv und RKO HDAC2 negativ mit 10 µM OX sowie der zugehörigen Kontrollen aus drei unabhängigen Versuchen. Die Varianz wurde mittels einfaktorieller ANOVA und Post Hoc Test nach Tukey berechnet; \* =  $p < 0,01$ ; \*\* =  $p < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant. Für die vollständige statistische Auswertung s. Tabelle A6.

**B:** Repräsentative Darstellung der Western Blot Analyse für die Proteine P53 und HSP90 in den vier verschiedenen RKO Zelllinien. Dargestellt sind die beiden Endpunkte 24 h und 48 h jeweils für die Kontrollen und die behandelten Zellen nach der Behandlung mit 10 µM OX. Molekulargewicht in kDa.

24 h nach der Behandlung mit OX unterscheidet sich der Anteil der Zellen in SubG1 in allen Zelllinien nicht signifikant von den unbehandelten Kontrollen (Abb. 20A/Tab. A6). Es befinden sich in allen vier RKO Zelllinien weniger als 5 % der Zellen in SubG1.

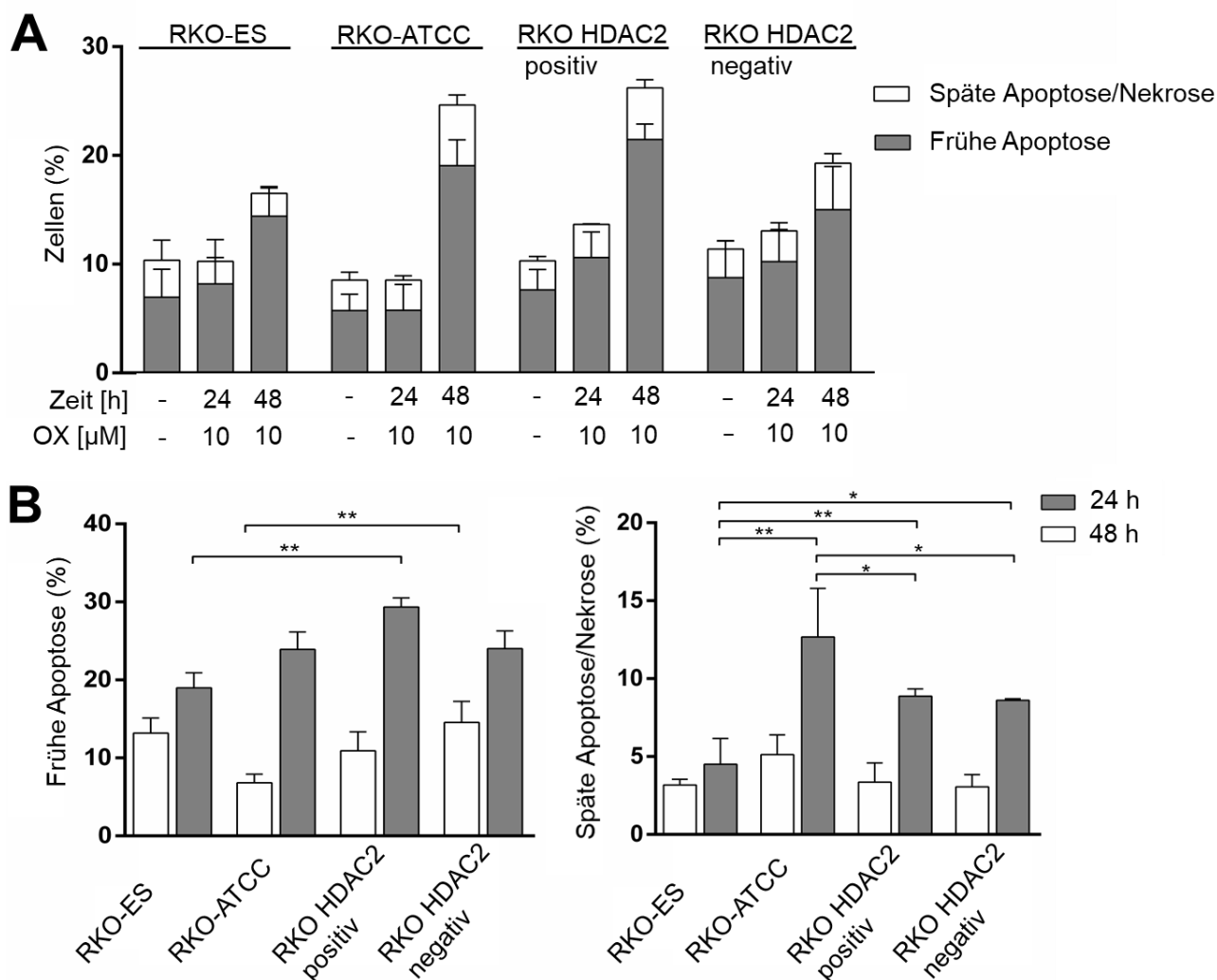
Nach einer Behandlungsdauer von insgesamt 48 h weisen erkennbar mehr Zellen eine verringerte DNA-Menge (SubG1-Anteil) auf (Abb. 20A/Tab. A6). Dies bedeutet, dass sich durch die Behandlung

mit OX in einem signifikant höheren Anteil an Zellen ein Zustand des eingeleiteten Zelltodes zeigt als in den zugehörigen Kontrollproben.

Vergleicht man die einzelnen RKO Zelllinien im Detail miteinander, gibt es zum Endzeitpunkt nach 48 h signifikante Unterschiede in der Ausprägung dieses Behandlungseffektes. So zeigt die RKO-ATCC Zelllinie mit circa 12 % den größten Anteil an Zellen in SubG1 und unterscheidet sich damit signifikant von den anderen drei Zelllinien (Abb. 20A/Tab. A6). Die Zelllinien RKO-ES, RKO HDAC2 positiv und RKO HDAC2 negativ unterscheiden sich dahingegen nicht signifikant voneinander und zeigen nach 48-stündiger Behandlung mit OX etwa den gleichen Anteil an Zellen in SubG1 (Abb. 20A).

Das Protein P53 wird analog zur Behandlung mit 5-FU ebenfalls in allen behandelten Zellen stärker exprimiert als in den Kontrollen. Als Zelltodmarker wird es in allen Zelllinien nach 48 h am stärksten exprimiert (Abb. 20B). Es lassen sich in der Induktion qualitativ keine Unterschiede zwischen den einzelnen RKO Zelllinien erkennen.

Um genauer einordnen zu können, welche Form des Zelltods in den RKO Zellen durch die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum OX induziert wird, folgte analog zur Behandlung mit 5-FU (s. 4.3.2) die Zelltodanalyse an unfixierten Zellen.



**Abbildung 21 Zelltodanalyse mittels Durchflusszytometrie nach Behandlung mit Oxaliplatin**

Für die Zelltodanalyse wurden die Zellen 24 h bzw. 48 h mit 10 μM OX behandelt und für die Messung am Durchflusszytometer mit Annexin/PI gefärbt. Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen. Für die vollständige statistische Auswertung s. Tabelle A7.

**A:** Mittelwerte +/- SD der verschiedenen Zelltodphasen für mit OX behandelte und unbehandelte Zellen.

**B:** Getrennte Darstellung der Mittelwerte +/- SD von früher Apoptose sowie später Apoptose/Nekrose für alle 4 Zelllinien. Die Varianz wurde mittels einfaktorieller ANOVA und Post Hoc Test nach Tukey berechnet; \* = p<0,05; \*\* = p<0,01.

Die Zelltodanalyse zur Differenzierung zwischen früher Apoptose und später Apoptose bzw. Nekrose zeigt für die Behandlung mit 10 μM OX in allen 4 RKO Zelllinien nach 24 h Behandlung nur eine diskrete, nicht signifikante, Zunahme der Zelltodfraktionen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (Abb. 21/Tab. A7).

Nach 48 h hingegen steigt der Zelltod in allen Zelllinien deutlich an. Die Zellen aller vier Zelllinien befinden sich hierbei vorwiegend in der frühen Apoptose (Abb. 21A). Es gibt weder nach 24 h noch nach 48 h Behandlung mit OX statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zelltodraten der einzelnen RKO Zelllinien (Abb. 21B). Tendenziell ist die frühe Apoptose in den RKO HDAC2 positiven Zellen mit einem Anteil von etwas über 20% am stärksten ausgeprägt (Abb. 21).



Betrachtet man isoliert den Anteil der Zellen in der späten Apoptose bzw. Nekrose zeigen sich hingegen deutlichere Unterschiede. In den RKO-ES Zellen zeigen sich mit etwas über 2 % die wenigsten spät-apoptotischen/nekrotischen Zellen. Des Weiteren zeigt diese Zelllinie im Gegensatz zu den drei anderen Zelllinien keinen prozentualen Anstieg dieser Zellpopulation von 24- zu 48-stündiger Behandlung mit OX. In der Folge unterscheidet sich der Anteil spät-apoptotischer/nekrotischer Zellen der RKO-ES Zelllinie nach 48 h Behandlung statistisch signifikant von der RKO-ATCC und der RKO HDAC2 positiven Zelllinie.

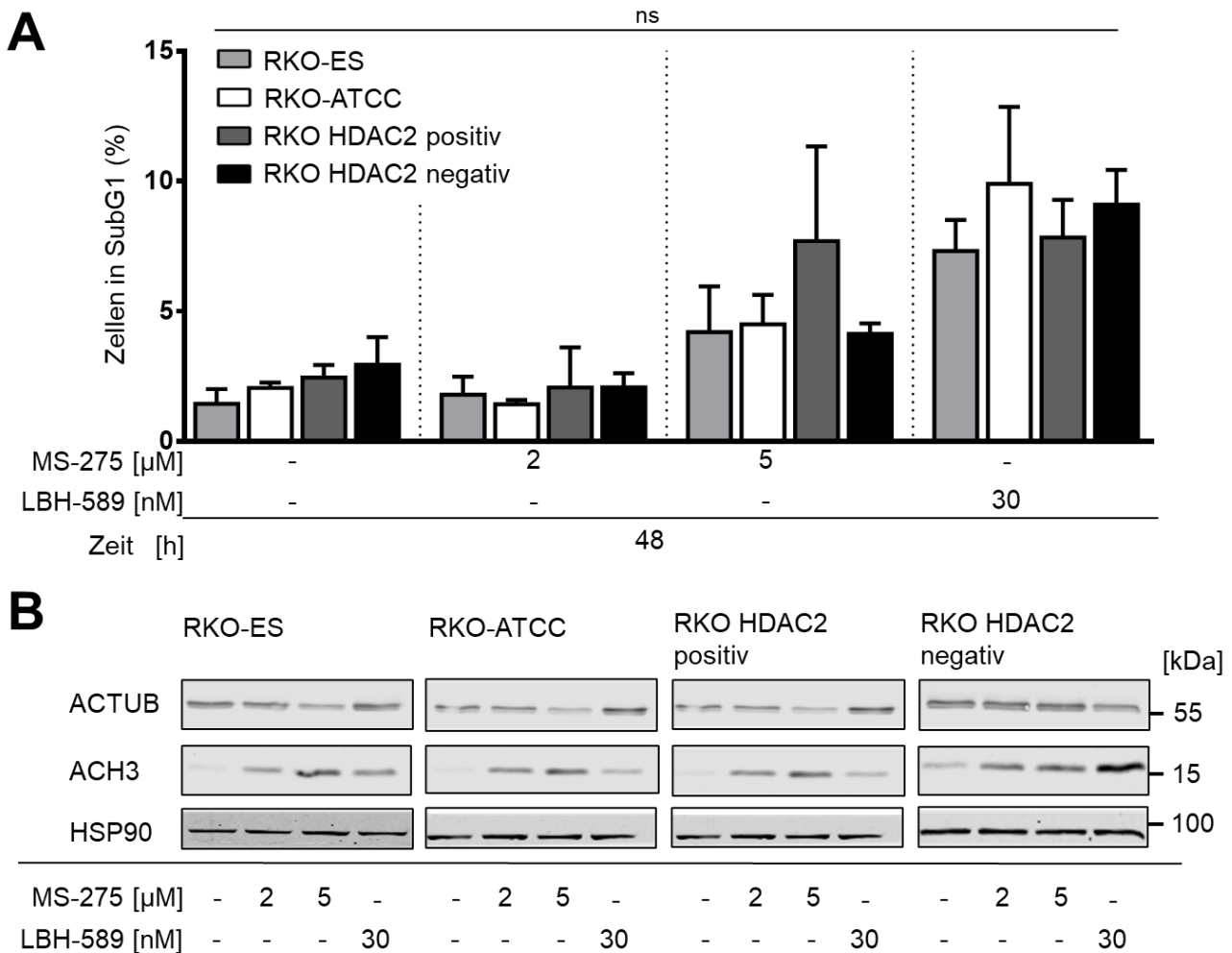
Hierbei ist der Prozentsatz an spät-apoptotischer/nekrotischer Zellen in den RKO-ATCC Zellen mit fast 6 % am größten, gefolgt von den RKO HDAC2 positiven Zellen mit circa 5 % und den RKO HDAC2 negativen Zellen mit nicht ganz 5 % (Abb. 21B).

Im Gegensatz zur RKO-ES Zelllinie zeigt sich in den anderen drei Zelllinien durch die längere Behandlung mit OX, also 48 h, deutlich mehr spät-apoptotische/nekrotische Zellen als nach 24-stündiger Behandlung.

### 4.3.4 Effekt von HDAC Inhibitoren in den RKO Zelllinien

Aufgrund zunehmender Erkenntnisse zum Einfluss und der Bedeutung von HDACs in verschiedenen Erkrankungen des Menschen, wurden im Laufe der Zeit mehrere Wirkstoffe entwickelt, die gezielt einzelne oder mehrere HDACs inhibieren. Diese Wirkstoffe sollen in der Zukunft die therapeutischen Möglichkeiten der verschiedenen Erkrankungen ergänzen (s. 2.3.2).

Exemplarisch wurden im Zuge dieser Arbeit die Effekte der beiden HDACi MS-275 und LBH-589 auf die vier verschiedenen RKO Zelllinien untersucht, um zu analysieren ob und wenn ja wie die Expression von HDAC2 Einfluss auf die Wirksamkeit dieser HDACi nimmt.



**Abbildung 22 Behandlung mit den HDACi MS-275 und LBH-589**

**A:** Mittelwerte +/- SD des SubG1-Anteils nach 48 h Behandlung der Zelllinien RKO-ES, RKO-ATCC, RKO HDAC2 positiv und RKO HDAC2 negativ mit 2 und 5 µM MS-275 und 30 nM LBH-589 sowie der zugehörigen Kontrolle von drei unabhängigen Versuchen. Die Varianz wurde mittels einfaktorieller ANOVA und Post Hoc Test nach Tukey berechnet; ns = nicht signifikant. Für die vollständige statistische Auswertung s. Tabelle A8.

**B:** Repräsentative Darstellung der Western Blot Analyse für die Proteine Acetyliertes Tubulin (ACTUB), Acetyliertes Histon H3 (ACH3) und HSP90 in den vier verschiedenen RKO Zelllinien. Dargestellt ist der Endpunkt 48 h jeweils für die Kontrollen und die behandelten Zellen. Molekulargewicht in kDa.

In allen vier RKO-Zelllinien erhöht sich der SubG1-Anteil nach der Behandlung mit 5 µM MS-275 sowie nach der Behandlung mit 30 nM LBH-589 erkennbar (Abb. 22A). Im Gegensatz dazu zeigt die

Behandlung mit der niedrigeren Konzentration MS-275 von 2  $\mu\text{M}$  in allen Zelllinien keinen wesentlichen Anstieg der Zellen in SubG1 verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (Abb. 22A). Jedoch unterscheidet sich der induzierte SubG1-Anteil nach allen Untersuchten HDACi Behandlungen nicht signifikant zwischen den einzelnen Zelllinien (Abb. 22A, Tab. A9).

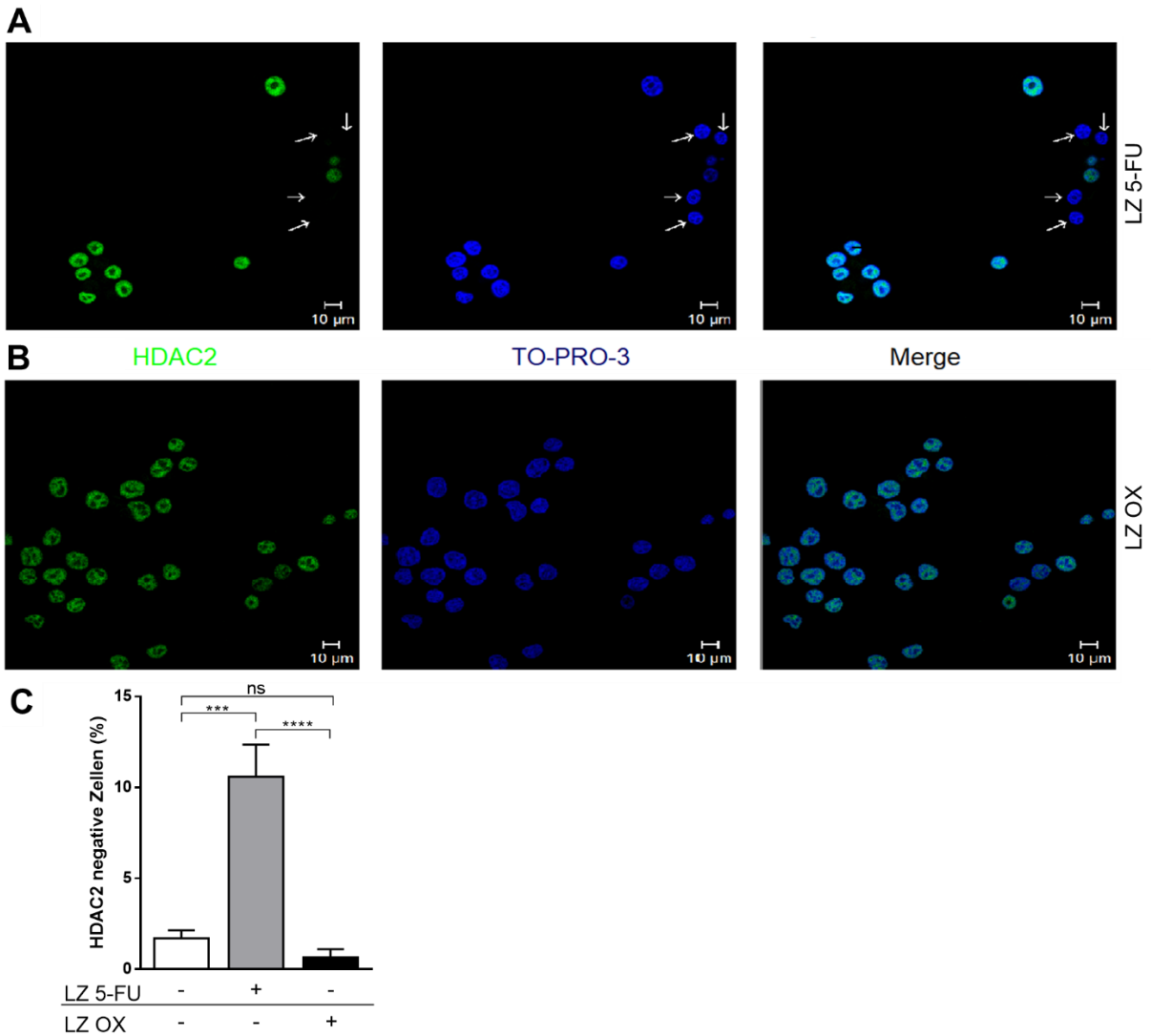
Die beiden HDAC Inhibitoren führen in der Western Blot Analyse zu einer vermehrten Hyperacetylierung von Proteinen, hier exemplarisch dargestellt durch die Analyse der Level an hyper-acetyliertem Tubulin (ACTUB) und hyper-acetyliertem Histon H3 (ACH3) (Abb. 22B). Nach der Behandlung mit LBH-589 nimmt der Anteil an ACTUB in den Zelllinien RKO-ES, RKO-ATCC und RKO HDAC2 positiv zu (Abb. 22B).

Die Behandlung mit MS-275 hingegen führt überwiegend zum Anstieg der Level an ACH3. Es zeigt sich ein dosisabhängiger Anstieg mit einer stärkeren Proteinbande nach der Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  MS-275 in allen vier Zelllinien (Abb. A6). In der RKO HDAC2 negativen Zelllinie zeigt sich zudem nach Behandlung mit LBH-589 eine deutlich stärkere Acetylierung von ACH3.

## 4.4 Induktion veränderter HDAC2 Expression innerhalb der RKO-ATCC Zelllinie

Eine Kernfrage, die sich im Laufe dieser Arbeit immer wieder stellte, bezieht sich auf die Ursache der diskrepanten HDAC2 Expression der RKO Zelllinien. Beruht der unterschiedliche Enzymstatus innerhalb einer Zelllinie auf einer rein akzidentellen Mutation, oder gibt es bestimmte *in vitro* Bedingungen, die eine Selektion von Einzelzellen nach HDAC2 Status bewirken.

In Hinblick auf die klinisch-medizinische Relevanz entschieden wir uns für eine Langzeitbehandlung mit den beiden vorher verwendeten Chemotherapeutika 5-FU und OX. Die zugrundeliegende Fragestellung war, ob eine längerfristige Behandlung in niederschwelliger Konzentration zu Veränderungen in prozentualen Anteile HDAC2 positiver und negativer Zellen an der Gesamtpopulation der RKO-ATCC Zelllinie führen kann.



**Abbildung 23 Die Langzeitbehandlung (LZ) von RKO-ATCC Zellen mit 5-FU und OX verändert die HDAC2 Expression**

**A:** Immunhistochemische Färbung von HDAC2 und Kernfärbung mit TO-PRO-3 in RKO-ATCC Zellen nach 14-tägiger Behandlung mit 2 μM 5-FU.

**B:** Immunhistochemische Färbung von HDAC2 und Kernfärbung mit TO-PRO-3 in RKO-ATCC Zellen nach 14-tägiger Behandlung mit 2 μM OX.

**C:** Mittelwerte +/- SD des prozentualen Anteils der HDAC2 negativen Zellen in der unbehandelten RKO-ATCC Zelllinie, sowie nach Langzeitbehandlung mit 5-FU oder OX von drei unabhängigen Versuchen. Die Varianz wurde mittels einfaktorieller ANOVA und Post Hoc Test nach Tukey berechnet; \*\*\* = p=0,001; \*\*\*\* = p<0,001; ns = nicht signifikant. Für die vollständige Auswertung s. Tabellen A9 und A10.

Nach zweiwöchiger Behandlung der RKO-ATCC Zelllinie mit 5-FU zeigt sich eine deutliche Reduktion der Zelldichte. Die langfristige, niedrigkonzentrierte Behandlung beeinflusst damit das Zellwachstum negativ. Die überlebenden Zellen erscheinen in der Immunfluoreszenz morphologisch intakt und nicht wesentlich verändert zur unbehandelten Zelllinie (Abb. 23A). Der Anteil der HDAC2 negativen Zellen in der RKO-ATCC Zelllinie erhöhte sich jedoch statistisch signifikant durch die Behandlung mit 5-FU auf durchschnittlich 10,67 %, verglichen mit einem Anteil von 1,7 % HDAC2 negativen Zellen in den unbehandelten Vergleichs-Zellen (Abb. 23C).

Die Langzeitbehandlung (LZ) mit OX mit identischem Versuchsaufbau zeigt mikroskopisch eine deutlich höhere Zelldichte verglichen mit den 5-FU-behandelten Zellen. Die Niedrigdosis von OX nimmt also weniger starken Einfluss auf die Zellteilung also die Behandlung mit 5-FU. In der Immunfluoreszenz zeigen sich nach OX-Behandlung einige Zellen, die sich aktiv in der Zellteilung befinden, bspw. erkennbar an Mitosespindeln der Zellkerne. Die mit OX behandelten Zellen wirken morphologisch jedoch insgesamt etwas plumper und aufgetrieben. Der Anteil der HDAC2 negativen Zellen liegt mit durchschnittlich 0,63 % negativer Zellen unterhalb des Mittelwertes negativer Zellen der unbehandelten Vergleichs-Zellen, jedoch ohne statistisch signifikanten Unterschied.

## 5 Diskussion

Krebserkrankungen zählen zu den führenden Todesursachen weltweit. Kolorektale Karzinome stehen weiterhin auf Platz 2 der karzinombedingten Todesfälle. Neben der hohen Letalität beeinflussen Neoplasien unsere Gesellschaft und unser Gesundheitssystem vor allem durch Therapiekosten, Rezidivraten und den Verlust von Lebensqualität und Arbeitskraft. Die stetige Verbesserung der Tumorthherapie hat daher nicht nur wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Nutzen, sondern für die vielen Betroffenen auch persönlichen Nutzen.

Seit einigen Jahrzehnten steht zunehmend die individualisierte Tumorthherapie im Fokus. Malignome werden dabei nicht nur zur Einordnung ihrer Entität, sondern auch zur Festlegung der Therapie immer genauer analysiert. Dazu werden tumorspezifische Biomarker verwendet [105]. Für einige Karzinome sind diese Biomarker bereits etablierter Bestandteil des *Tumorstagings* im Rahmen der Diagnostik vor Therapiebeginn oder zur Validierung des Therapieansprechens im Verlauf [106].

Es gibt für KRK bereits einige prädiktive Biomarker hinsichtlich des Therapieansprechens neuartiger Immuntherapien. Diese beziehen sich jedoch größtenteils auf bereits metastasierte Tumorstadien [107, 108]. Zahlreiche Studien suchen nach weiteren prognostischen oder prädiktiven Biomarkern, v. a. durch genetische oder epigenetische Veränderungen wie z. B. DNA-Methylierung [109]. Bisher wurde die Enzymgruppe der HDACs dabei weitestgehend außer Acht gelassen, obwohl bekannt ist, dass verschiedene HDACs eine Bedeutung für Tumorentstehung und -erhaltung haben. Ob diese Enzymgruppe einen möglichen neuen Biomarker bietet, um KRK weiter zu charakterisieren und die Therapie noch individueller zu gestalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit betrachtet.

Da solide Tumore jedoch nicht mehr als einheitliche Tumormasse angesehen werden sollten, spielt auch die heterogene Expression dieser Biomarker oder anderer Proteine eine immer größere Rolle [80, 108]. Nicht alle Zellen eines Tumorverbandes sind molekulargenetisch identisch. Diese Heterogenität in einen kausalen Zusammenhang mit Therapieansprechen, Rezidivrate und Prognose zu setzen, wird noch einige Jahre Bestandteil der Forschung sein. Für die RKO Zelllinie untersuchte diese Arbeit eine mögliche Heterogenität bezüglich der HDACs und dem Ansprechen auf etablierte und noch nicht etablierte Therapeutika.

## 5.1 Intra-tumorale Heterogenität durch HDAC2

*Lutz et al.* zeigten an Präparaten von KRK *in vivo* die intra-tumorale Heterogenität von HDAC1 [80]. In den untersuchten Proben zeigte sich für HDAC2 eine einheitliche Expression innerhalb einer Tumormasse. Der Stellenwert von HDAC2 in der Karzinogenese wurde dadurch deutlich, dass HDAC2 in den Karzinomen deutlich stärker exprimiert wurde als in ihren benignen Vorstufen [80, 110]. Lediglich *Ropero et al.* konnte in einem Tumorpräparat eines primären KRKs mit mutiertem HDAC2 Status ein heterogenes Verteilungsmuster für die HDAC2 Expression in der Immunfluoreszenz zeigen. In den anderen HDAC2 mutierten Tumoren zeigten sich hingegen der vollständige Verlust der Expression [111].

In der Zellkultur gibt es bisher keinen Nachweis einer heterogenen Verteilung der HDAC2 Expression. Wir konnten für die humane RKO Zelllinie eindeutig zeigen, dass es ein heterogenes Verteilungsmuster in der Proteinexpression von HDAC2 gibt (Abb. 9). Mit einem Anteil von weniger als 2 % HDAC2 negativer Zellen scheint die Expression von HDAC2 unter guten Wachstumsbedingungen ohne störende äußere Einflüsse, wie z. B. fehlende Substrate, chemische Hemmstoffe, Platzmangel aufgrund zu hoher Zelldichte, einen Wachstums- und Überlebensvorteil zu bieten. Für HDAC1 hingegen zeigte sich ein einheitliches Verteilungsmuster, 100 % der RKO Zellen exprimierten HDAC1. Diese intra-tumorale Heterogenität durch HDAC2 scheint auch die Erklärung zu sein, warum in verschiedenen Untersuchungen die RKO Zelllinie als HDAC2 Wildtyp [112] und in anderen Untersuchungen als HDAC2 defizient [111] charakterisiert wird.

Für den Verlust von HDAC2 wurde bisher eine *frameshift* Mutation im HDAC2 Gen (*A9 coding microsatellite repeat of exon 1*) verantwortlich gemacht, die zum völligen Fehlen von HDAC2 führte [111]. Eine zukünftig noch zu klärende Frage ist, ob auch das Fehlen von HDAC2 in einzelnen Zellen auf diese Mutation zurückzuführen ist. Zudem stellt sich die Frage, inwieweit es sich um eine zufällige Mutation handelt oder eine Mutation, die durch bestimmte äußere Bedingungen begünstigt werden kann. Ist diese Mutation spezifisch für kolorektale Karzinome oder steht sie eher im Zusammenhang mit Mikrosatellitenstatus oder Funktion des MMR-Systems?



## 5.2 Etablierung RKO Zelllinien mit unterschiedlichen HDAC2 Expression

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es aus der ursprünglichen RKO-ATCC Zelllinie mit heterogener HDAC2 Expression zwei weitere Zelllinien zu etablieren. Eine davon mit HDAC2 Expression in allen Zellen und die andere mit völlig fehlender Expression. Zusätzlich stand eine weitere Zelllinie (RKO-ES) ebenfalls mit HDAC2 Defizienz zur Verfügung (Abb. 10).

Morphologisch zeigten sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien. Damit scheint der HDAC2 Status keinen direkten Einfluss auf die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten oder den Wachstumseigenschaften im Zellverband zu haben (Abb. 14). Jedoch muss kritisch hinterfragt werden, ob die Morphologie in der Hellfeld-Mikroskopie ausreichend genau ist, um solche Aussagen mit hoher Sicherheit treffen zu können. Allerdings scheinen die bisher bekannten Funktionen von HDAC2 und den anderen Klasse 1 HDACs diese Beobachtung weiter zu bestätigen. Trotz vielfältiger Funktionen gibt es bisher keinen bekannten Zusammenhang von HDAC2 und der Ausbildung von Zellkontakten oder der Ausbildung von Zellverbänden [77, 113, 114]. Um diese Eigenschaften weiter zu charakterisieren könnte man immunhistochemische Färbungen von Zelladhäsions- oder Oberflächenmolekülen, wie z. B. verschiedene Cadherine oder Integrine, anschließen, um die sichtbaren Zellkontakte genauer zu spezifizieren.

Betrachtet man die Verteilung der einzelnen Zellzyklusphasen, fällt lediglich auf, dass sich signifikant weniger RKO-ES Zellen in G1 befinden als es in den anderen 3 Zelllinien der Fall ist (Abb. 12). Vor allem HDAC1 aber auch HDAC2 und 3 sind Teil von multifaktoriellen Komplexen und Regulierung so den Übergang von G1 in S-Phase und damit die Zellproliferation [115, 116]. Der niedrigere Anteil der RKO-ES Zellen in G1 und damit prozentual mehr Zellen in den anderen Zellzyklusphasen ließe sich demnach durchaus mit einer gesteigerten Proliferation durch den Verlust von HDAC2 erklären. Allerdings widerspricht dem, dass die RKO HDAC2 negativen Zellen dies nicht zeigen. Die Frage ist, ob die Anzahl von  $n = 3$  Versuchen ausreichend war, um diesen Unterschied darzustellen oder ob sich die RKO-ES Zellen in einer weiteren, bisher nicht detektierten Eigenschaft von den anderen drei RKO Zelllinien unterscheiden. Dies könnte durch weiterführende Untersuchungen zur Zellzyklusregulation zukünftig genauer untersucht werden. Zu zweitem passt, dass Krebszellen eine hohe genetischen Instabilität mit einer nicht zu vernachlässigen Rate an Spontanmutationen aufweisen [24]. Zudem ist die RKO-ES Zelllinie eben nicht im Rahmen dieser Arbeit aus der RKO ATCC Zelllinie entstanden, sondern wurde für eine unbestimmte Zeit unabhängig von der Ursprungszelllinie in verschiedenen Laboratorien kultiviert. Daher ist es durchaus wahrscheinlich, dass die beobachteten Unterschiede nicht direkt auf die HDAC2 Expression zurückgehen.

### 5.2.1 HDAC2 Status ohne Einfluss auf Expression anderer Klasse 1 HDACs

Aufgrund gleicher Wirkmechanismen übernehmen Klasse 1 HDACs häufig ähnliche Funktionen. Zudem kann der Verlust einer Klasse 1 HDAC durch eine Überexpression einer anderen HDAC (teil-) kompensiert werden. Für einige enzymatische Komplexe ist diese Kompensation ausreichend, um die volle Funktion zu erhalten, in anderen Teilbereichen gelingt dies jedoch nur unvollständig [117, 118].

*In vitro* zeigt die RKO Zelllinie unabhängig von ihrem HDAC2 Status keine veränderte Expression anderer Klasse 1 HDACs (Abb. 11). Allerdings muss man kritisch hinterfragen, ob die Western Blot Analyse ausreichend sensitiv ist, solche Veränderungen zu detektieren. Denkbar wäre, dass die Kompensation eben nicht über eine vermehrte Expression des Enzyms, die sich mittels Western Blot darstellen ließe, sondern vielmehr durch eine Steigerung der enzymatischen Aktivität anderer HDACs verursacht wird. Nähere Untersuchungen zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität könnten weitere Erkenntnisse liefern, ob der Verlust von HDAC2 in einzelnen Zellen oder in allen Zellen durch andere HDACs kompensiert wird.

### 5.2.2 Verlust von HDAC2 unabhängig von Epithelial-Mesenchymaler Transition

Unter epithelialer-mesenchymaler Transition (EMT) versteht man die Veränderung vom epithelialen Zelltyp zum mesenchymalen Phänotyp über die Veränderung spezifischer Oberflächenstrukturen. Dabei verlieren die Zellen ihre für epitheliale Zellen typischen Zellkontakte und verändern ihr Zytoskelett. Dadurch können die mesenchymalen Zellen den Zellverband verlassen und migrieren [119, 120]. Neben physiologischen Prozessen wird dieser Prozess v. a. in malignen Krebszellen beobachtet. Die Veränderung ist ein entscheidender Schritt in der Karzinogenese und Metastasenbildung, da die mesenchymalen Eigenschaften die Zellmigration und ein invasives Wachstum ermöglichen [120].

KRK als inhomogene Entität verschiedenster histopathologischer Tumore zeigen eine hohe Variabilität in der Expression epithelialer oder mesenchymaler Merkmale [63]. Die RKO Zelllinie zeigt dabei einen inkompletten EMT Phänotyp, als mesenchymaler Marker wird lediglich VIMENTIN exprimiert [63].

$\beta$ -CATENIN lässt keine Unterscheidung zwischen epithelialelem und mesenchymalem Phänotyp zu, akkumuliert jedoch als Bestandteil des WNT-Signalweges während der EMT sowohl im Zytosol als auch im Zellkern [121]. Im Zellkern führt die Akkumulation zur vermehrten Expression von für die

Zellteilung notwendiger Gene. Demnach ist der vermehrte Nachweis von  $\beta$ -CATENIN Zeichen einer vermehrten Zellteilung und indirektes Zeichen einer beginnenden EMT.

Die vier in dieser Arbeit untersuchten RKO Zelllinien zeigen eine einheitliche Expression von VIMENTIN und  $\beta$ -CATENIN verglichen mit der Proteinbeladung (Abb. A4). Es kommt in keiner der vier Zellreihen zu einer veränderten Proteinexpression. Der HDAC2 Status scheint daher nicht mit einer EMT in Zusammenhang zu stehen. Damit gibt es keine Hinweise auf eine erhöhte Invasivität der RKO Krebszellen durch den Verlust von HDAC2.

## 5.3 Einfluss der HDAC2 Expression auf die Chemosensitivität

Ab Stadium II des KRK stellt die Chemotherapie einen wesentlichen Therapiepfiler dar. Dabei werden immer noch v. a. Derivate von 5-FU und OX verwendet oder kombiniert [40]. Während die adjuvante Chemotherapie für Stadium III Karzinome eine eindeutige Verbesserung des Therapieansprechens und des 5-Jahres-Überleben darstellt, gibt es Studien, die die Indikation für Stadium II Karzinome immer mehr in Frage stellen [122, 123]. Unstrittig ist, dass allein die Betrachtung des Tumorstadiums nicht ausreichend ist, um die Prognose und das Therapieansprechen sicher zu bewerten. Neben dem Tumorstadium gibt es zahlreiche Faktoren, die das Gesamtüberleben durch bestimmte Therapien positiv oder negativ beeinflussen. Ziel ist es, in Zukunft immer mehr dieser Faktoren sicher zu identifizieren und so individuelle Therapiestrategien für die Patienten zu entwickeln und die Prognose damit zu maximieren [124]. Molekulare Veränderungen, zunehmende Resistenzmechanismen und die Selektion von Chemo-resistenten Krebsstammzellen sind nur einige Beispiele, die in die Bewertung verschiedener Therapien mit einbezogen werden müssen [34, 125, 126].

Diese Arbeit untersucht den Zusammenhang zwischen HDAC2 Expression in der RKO-Zelllinie und dem Therapieansprechen auf klassische Chemotherapeutika und den neueren HDACi.

### 5.3.1 HDAC2 Verlust verringert *in vitro* Wirksamkeit von 5-Fluorouracil

5-FU ist etablierter Bestandteil der Erstlinientherapie von KRK im Rahmen einer systemischen Chemotherapie [40]. Das Einführen von 5-FU als Chemotherapeutikum bei KRK hat die Prognose der betroffenen Patienten deutlich verbessert. Es ist aus den Therapieregimen kaum mehr wegzudenken. Allerdings gibt es immer häufiger resistente Krebszellen mit fehlendem Ansprechen auf die Behandlung mit 5-FU. Diese resistente Subgruppe wird auch ‚colon cancer stem cells‘ genannt und als Ursprung für Tumorentstehung, Metastasenbildung und Krankheitsrückfall angesehen[45, 126-128].

Die beiden RKO-Zelllinien mit fehlender HDAC2 Expression, RKO-ES und RKO HDAC2 negativ, sprechen deutlich weniger auf die Behandlung mit 5-FU an. 48 Stunden nach der Behandlung sind signifikant ( $p < 0,0001$ ) weniger Zellen in SubG1 verglichen mit den beiden anderen Zelllinien mit vollständiger bzw. überwiegender Expression von HDAC2 (Abb. 16).

Die Wirksamkeit von 5-FU in der Krebszelllinie RKO scheint damit positiv durch HDAC2 Expression beeinflusst zu werden. Der Verlust von HDAC2 in wenigen Zellen beeinflusst das Therapieansprechen hingegen nicht signifikant (Abb. 15). Passend dazu wird in den beiden Zelllinien mit HDAC2 Expression quantitativ mehr P53 als Zelltodmarker exprimiert.

Allerdings unterscheiden sich die beiden HDAC2 negativen Zelllinien ebenfalls signifikant voneinander. Der SubG1-Anteil der RKO-ES Zellen ist signifikant niedriger als der der RKO HDAC2 negativen Zellen ( $p < 0,05$ ). Dies lässt vermuten, dass die *in vitro* Wirksamkeit nicht nur durch den unterschiedlichen HDAC2 Status der vier Zelllinien beeinflusst wird. Die RKO-ES Zelllinie, die am längsten von der Ursprungszelllinie RKO-ATCC getrennt kultiviert wurde, zeigt möglicherweise die höchste Chemoresistenz für 5-FU, weil neben dem Verlust von HDAC2 eine weitere, bisher nicht identifizierte, Mutation die Resistenz erhöht.

Die spezifischere Zelltodanalyse zeigt, dass die Behandlung mit 5-FU in allen vier Zelllinien zu vermehrtem Zelltod führt (Abb. 17), jedoch unterschiedlich schnell und stark. In den HDAC2 negativen Zellen wird der Zelltod durch 5-FU schneller eingeleitet. 24 h nach Behandlung befinden sich in den HDAC2 negativen Zelllinien deutlich mehr Zellen bereits in einer der beiden Zelltodfraktionen als in den beiden überwiegend HDAC2 positiven Zelllinien. Nach 48 h Gesamtbehandlungsdauer sind absolut mehr Zellen der HDAC2 positiven Zelllinien apoptotisch. HDAC2 nimmt dementsprechend direkten Einfluss auf die Kinetik des von 5-FU induzierten Zelltods. Nach 24 h ist lediglich der Unterschied von Zellen in früher Apoptose zwischen RKO-ATCC und RKO HDAC2 negativ statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ). Die RKO-ATCC Zelllinie zeigt dabei nach 24 h die höchste Rate vitaler Zellen. Nach 48-stündiger Behandlungsdauer unterscheiden sich die Zelltodfraktionen der vier Zellreihen signifikant voneinander. Während in den Zelllinien RKO-ES und RKO HDAC2 negativ nur ein minimaler Anstieg des Zelltodes im Vergleich zur 24-stündigen Behandlung mit 5-FU zu erkennen ist, steigt der Anteil v. a. der frühen Apoptose in den Zelllinien RKO-ATCC und RKO HDAC2 positiv deutlich an.

Der Verlust von HDAC2 führt also dazu, dass 5-FU zwar schneller Zelltod induziert, verhindert jedoch einen höheren, mit HDAC2 positiven Zellen vergleichbaren, Gesamtteil apoptotischer Zellen. Die Gesamtzytotoxizität von 5-FU scheint also in der RKO Zelllinie durch fehlende HDAC2 Expression deutlich eingeschränkt zu werden. Um auf molekularer Ebene den kausalen Zusammenhang dieser Hypothese bestätigen zu können, wäre eine genauere, zeitauflösende Analyse der einzelnen Signalwege sinnvoll, bspw. durch den Vergleich der zeitlichen Induktion verschiedener Caspasen. Eine weitere noch offene Fragestellung ist, auf welcher Ebene innerhalb dieser Signalweiterleitung die HDAC2 Expression die Wirksamkeit von 5-FU beeinflusst?

Zahlreiche Forschungsgruppen beschäftigen sich damit, wie es in Dickdarmkrebszellen zu einer Resistenz gegenüber 5-FU als breit eingesetztes Zytostatikum kommt. Es gibt zahlreiche, z. T. konträre, Hypothesen ohne sichere Untersuchung der Resistenzmechanismen auf molekularer Ebene. Einige beschäftigen sich dabei mit genetischen Subtypen, Oberflächenproteinen, verändertem Metabolismus oder aber auch mit epigenetischen Veränderungen oder veränderter Expression der TS [42, 127, 129-131]. *Kang et al.* zeigten einen Zusammenhang zwischen 5-FU Resistenz und verändertem Proteinlevel von HDACs und HATs. Die von ihnen untersuchten

resistenten Krebszellen zeigten eine gesteigerte HDAC1 Expression [131]. Die Expression von HDAC2 wurde hingegen nicht untersucht. Neben der veränderten Proteinexpression von HDAC1 zeigten sie v. a. den Zusammenhang 5-FU-Resistenz und dem hochregulierten Transkriptionsfaktor NRF2 [131]. Zu untersuchen wäre zukünftig, ob die RKO Zelllinien abhängig von ihrem HDAC2 Status ebenfalls eine veränderte Expression von NRF2 zeigen und was genau der kausale Zusammenhang zwischen veränderter Proteinexpression und 5-FU-Resistenz ist. Induziert die vorbestehende Resistenz eine veränderte HDAC Expression oder führt eine veränderte HDAC Expression erst, wie in unseren Untersuchungen anzunehmen, zu einer Chemoresistenz gegen 5-FU? Sind in den RKO Zellen neben HDACs auch weitere Histon-modifizierende Proteine hoch- oder runterreguliert, sowie es *Kang et al* für ihre 5-FU resistenten Zellen zeigten [131] ?

In vivo scheint die Wirksamkeit einer Monotherapie mit 5-FU zudem von der MSS abzuhängen. Patienten mit MSI Tumoren zeigen einen geringeren therapeutischen Benefit auf die Monotherapie von 5-FU. Einen besseren Outcome zeigen Kombinationstherapien von 5-FU und OX oder die Kombination neuere Immuntherapien [132]. Beeinflussen die MSI und der HDAC2 Status sich in den RKO Zellen? Verstärken sich die beiden Faktoren unter Umständen und führen so zur deutlich geringeren Auswirkung der Monotherapie von 5-FU in den RKO-ES Zellen? Ist der Effekt von HDAC2 auf die Wirksamkeit von 5-FU auch in MSS kolorektalen Karzinomzelllinien darstellbar? Gibt es bei den resistenteren RKO Zellen ohne HDAC2 Expression eine veränderte Expression von Oberflächenmerkmalen, im Sinne der von *Paschall et al.* beschriebenen Expression von CD133 und CD24 [129]?

### 5.3.2 HDAC2-Verlust verringert *in vitro* Wirksamkeit von Oxaliplatin

OX wird als hochpotentes Therapeutikum als Bestandteil einer Polychemotherapie bei diversen soliden Tumoren eingesetzt [50, 133, 134]. Trotz starker zytotoxischer Eigenschaften gibt es Tumorzellen, die gegen OX resistent sind oder es unter Therapie werden [124, 135]. OX zeigt zudem ein breites Spektrum an unerwünschten Arzneimittelwirkungen, die in einigen Fällen zum Therapieabbruch führen und bei Persistenz die Lebensqualität der Patienten dauerhaft einschränken können [54, 55]. Daher ist es umso wichtiger im Vorfeld identifizieren zu können, welche Patienten von der Therapie profitieren und solche Patienten mit resistenteren Zellen im Vorfeld auszuschließen. Eine solche individuelle Tumorthherapie ist momentan jedoch noch nicht klinisch umsetzbar, weil relevante Erkenntnisse zu Resistenzausbildung und den zugehörigen Mechanismen fehlen.

In unseren Untersuchungen ist die mittlere Zelltodinduktion (5-15 % SubG1 nach 48 h) durch OX in allen RKO-Zellen deutlich geringer als nach Behandlung mit 5-FU. (Abb. 18 und 20). Nach 24 h zeigte sich in keiner der vier untersuchten Zelllinien eine signifikante Erhöhung des SubG1-Anteils.

Nach weiteren 24 h Behandlung, also einer Gesamtbehandlungsdauer von 48 h, ist der SubG1-Anteil deutlich angestiegen, d. h. die Behandlung mit OX hat in allen vier Zelllinien zu einem vermehrten Zelltod geführt. Signifikant unterscheidet sich dabei die RKO-ATCC Zelllinie von den anderen drei Zelllinien. Die RKO-ATCC Zellen zeigen den höchsten prozentualen Anteil von SubG1 (Abb. 20). Ohne statistische Signifikanz und ohne Berücksichtigung der unterschiedlichen Standardabweichung zeigen die RKO HDAC2 positiven Zellen im Mittel den zweitgrößten Anteil an Zellen in SubG1. Bei insgesamt niedriger Zelltodrate und relativ großer Standardabweichung muss bedacht werden, dass die geringe Anzahl an Versuchen unter Umständen nicht ausreichend ist alle Unterschiede sicher zu zeigen.

P53 hingegen wird bereits nach 24-stündiger Behandlung mit OX schon deutlich stärker exprimiert als in der unbehandelten Kontrolle. Nach 48-stündiger Behandlung wird P53 in allen vier RKO Zelllinien noch stärker exprimiert (Abb. 20B). Dies zeigt, dass der Zelltod durch OX bereits auf molekularer Ebene eingeleitet wurde, sich jedoch nicht als Endpunkt in der Durchflusszytometrie zeigt (Abb. 20).

In der Zelltodanalyse ist die Gesamtzelltodfraktion in der RKO HDAC2 positiven Zelllinie am größten, allerdings nicht signifikant höher als in der überwiegend HDAC2 positiven Zelllinie RKO-ATCC. Die beiden negativen Zelllinien zeigen hingegen auf die Behandlung mit OX deutlich geringere Anteile in einer der beiden Zelltodfraktionen. Die frühe Apoptose zeigt keine relevanten Unterschiede zwischen den vier Zelllinien. Für die späte Apoptose/Nekrose ist der Unterschied zwischen RKO-ES mit geringstem Anteil und RKO-ATCC bzw. RKO HDAC2 positiv statistisch signifikant.

Im gemeinsamen Vergleich beider Versuche scheinen die beiden (überwiegend) HDAC2 positiven Zelllinien insgesamt stärker auf die Behandlung mit OX anzusprechen (Abb. 20 und 21). Ob die Wirksamkeit durch eine heterogene Expression von HDAC2 zusätzlich verstärkt wird, wie die Zellzyklusanalyse vermuten lässt, konnte die Zelltodanalyse nicht bestätigen. Diese Hypothese könnte in zukünftigen Untersuchungen validiert oder widerlegt werden.

Erneut zeigt sich die RKO-ES Zelllinie als Zelllinie mit größter Resistenz gegen die chemotherapeutische Behandlung. Die RKO HDAC2 negative Zelllinie zeigt eine intermediäre Resistenz, die a. e. kausal auf den Verlust von HDAC2 zurückzuführen ist. Unsere Untersuchungen lassen allerdings bisher keine Schlüsse auf die molekularen Vorgänge der verminderten Wirksamkeit des OX zu.

Bekannt ist, dass OX in RKO Zellen über Induktion der MAP-Kinase p38 den Level von anti-apoptotischen SURVIVIN messbar reduziert, was zumindest z. T. den Mechanismus der Zytotoxizität erklärt [136]. Denkbar ist, dass HDAC2 diesen Weg positiv beeinflusst, entweder durch direkte Inhibierung der SURVIVIN Expression oder über bisher nicht bekannte Zwischenschritte. In späteren Untersuchungen kann dies über den Vergleich der Expression dieser Signalwege überprüft werden.

Die Inhibition von pro-apoptotischen bzw. Induktion von anti-apoptotischen Signalwegen scheint für die Chemoresistenz gegen OX ebenfalls von Bedeutung zu sein [137]. Allerdings werden in vielen Studien weitere Erkenntnisse mit einer Resistenzausbildung in Verbindung gebracht. Beispielsweise scheinen veränderte zelluläre Prozesse wie vermehrte DNA-Reparaturmechanismen, different exprimierte Gene, eine veränderte intrazelluläre Aufnahme oder die direkte Neutralisation des Agens [135, 137-139]. Inwieweit diese verschiedensten Prozesse durch HDAC2 beeinflusst werden könnten, müssen nachfolgende Untersuchungen zeigen. Wird NF1C als korrelierender Faktor einer OX-Resistenz [135] in den vier RKO-Zelllinien unterschiedlich stark exprimiert? Gibt es einen Zusammenhang zwischen DNA-Reparaturmechanismen und HDAC2 Expression? Dass HDAC2 relevanten Einfluss auf das Therapieansprechen nimmt, konnten unsere Daten zeigen, die molekularen Vorgänge dazu gilt es in Zukunft zu detektieren.

### 5.3.3 Wirksamkeit von HDAC-Inhibitoren unabhängig von HDAC2 Status der RKO Zellen

Als HDAC-Inhibitoren wird eine Gruppe strukturell sehr unterschiedlicher Moleküle zusammengefasst, die eine oder mehrere HDACs inhibieren. Gemeinsam ist ihnen die Wirksamkeit gegen verschiedene Krebszellen. Zum einen führen HDACi zu einem Arrest des Zellwachstums und zum anderen induzieren sie direkt die Apoptose in Krebszellen [74, 84, 140]. LBH-589 (Panobinostat) inhibiert als Pan-HDACi alle Klassen der HDACs, während MS-275 (Entinostat) lediglich Klasse 1 HDACs und darunter v. a. HDAC1 und HDAC3 hemmt [89, 95].

Die Wirksamkeit der beiden von uns verwendeten HDACi, MS-275 und LBH-589, korreliert in den vier RKO Zelllinien nicht mit der HDAC2 Expression (Abb. 22). Die Behandlung mit MS-275 in niedriger Dosierung führt in keiner Zelllinie zu vermehrtem Zelltod. Der SubG1 Anteil unterscheidet sich nicht signifikant von der zugehörigen Kontrolle. MS-275 in höherer Konzentration sowie LBH-589 induzieren in allen RKO Zellen den Zelltod, erkennbar durch einen deutlichen Anstieg der SubG1 Anteile. Zwischen den vier Zelllinien gibt es allerdings keine erkennbaren Unterschiede. Die Expression acetylierter Proteine durch die Behandlung mit HDACi unterscheidet sich nicht zwischen den RKO Zelllinien (Abb. 22).

Während unsere Untersuchung keinen Zusammenhang zwischen HDACi Wirkung und HDAC2 Status für MS-275 und LBH-589 zeigen, wurde in früheren Untersuchungen ein Zusammenhang zwischen HDAC2 Verlust und Wirksamkeit verschiedener HDACi beobachtet [111]. Allerdings sind diese Zusammenhänge eben nicht einheitlich auf verschiedenen Zelllinien und HDACi übertragbar. Es wurden konträre Beobachtungen gemacht, in einigen Zelllinien wie der RKO Zelllinie scheint der HDAC2 Verlust eine Resistenz gegenüber dem HDACi Trichostatin A zu bewirken, während die HDAC2 Expression die Wirksamkeit von anderen HDACi wie z. B. Valproat nicht beeinflusst [111].



Möglicherweise können diese Beobachtungen in der Zukunft durch weitere Untersuchungen gemeinsam betrachtet und so in einen kausalen Zusammenhang gesetzt werden.

Neben der direkten zytotoxischen Wirkung von HDACi sind v. a. Kombinationstherapien Gegenstand von verschiedenen Forschungen [141, 142]. LBH-589 führte als Kombinationstherapie in ursprünglich TRAIL-resistenten kolorektalen Karzinomzelllinien zu einer verstärkten Wirkung von TRAIL [141]. Möglicherweise würden sich in einer Kombinationstherapie der HDACi mit einer anderen Substanz Unterschiede zwischen den vier RKO Zelllinien demaskieren, die weitere Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen HDAC2 Status und Inhibierung von HDAC liefern. In Anbetracht der aktuellen Ergebnisse erscheinen HDACi für RKO Zelllinien keine aussichtreiche Therapieoption darzustellen.

## 5.4 Langzeitbehandlung mit Chemotherapeutika führen zu veränderter HDAC2 Expression

Klonale Heterogenität innerhalb verschiedener Tumore oder Karzinomzelllinien wurde schon häufig beobachtet [2, 34, 36], ist aber bisher unzureichend verstanden. Es gibt viele Hypothesen wie diese Heterogenität entsteht, wodurch sie induziert oder gehemmt werden kann oder welchen therapeutischen Einfluss oder Nutzen dies haben könnte [34, 143].

Für die RKO Zelllinie zeigten unsere Untersuchungen bereits eine veränderte Wirksamkeit der Chemotherapeutika 5-FU und OX bedingt durch heterogene HDAC2 Expression. Doch wie kam es zum Verlust von HDAC2 in einzelnen Zellen der Mutterzelllinie RKO-ATCC? Kann diese veränderte Expression *in vitro* induziert werden oder handelt es sich lediglich um eine zufällige Mutation? Medikamentöse Chemotherapie kann in Tumoren unter oder nach Therapie neue Mutationen generieren und so klonal veränderte Tumorzellen induzieren [144, 145]. Die Frage war daher, welchen Einfluss eine längerfristige Chemotherapie *in vitro* auf die RKO Zelllinie hat.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine 14-tägige Therapie mit 5-FU oder OX zu einer statistisch signifikanten Veränderung des Expressionsmusters von HDAC2 führt (Abb. 23). Unter idealen Kulturbedingungen liegt der Anteil der HDAC2 negativen Zellen in der RKO-ATCC bei weniger als 2 %. Eine niedrig dosierte Behandlung mit 5-FU über insgesamt 14 Tage führt zu einer deutlichen Erhöhung der HDAC2 negativen Zellen. Diese Langzeitbehandlung übt dementsprechend *in vitro* einen Selektionsdruck auf die RKO-ATCC Zellen aus, der zum verstärkten Verlust von HDAC2 führt. Dieses veränderte Expressionsmuster kann auf verschiedenen Wegen entstanden sein. Die Langzeitbehandlung könnte den Verlust von HDAC2 in ursprünglich HDAC2-Wildtyp Zellen direkt induzieren. Auf der anderen Seite könnte dieser Effekt auch auf einer geringeren Wirksamkeit von 5-FU in HDAC2 negativen Zellen beruhen. Durch verringerte Wirksamkeit wird die Apoptose in diesen Zellen weniger stark induziert, die Zellteilung wird weniger stark gehemmt und es überleben unter Therapie mehr HDAC2 negative Zellen. Diese Hypothese passt stimmig zu unseren vorherigen Ergebnissen, die klar gezeigt haben, dass HDAC2 negative Zellen eine höhere Resistenz gegenüber 5-FU besitzen (Abb. 18 und 19). Sollte sich in weiterführenden Untersuchungen zeigen, dass diese *in vitro* Erkenntnisse auch *in vivo*, z. B. in Mausmodellen darstellbar sind, hätte dies klare klinische Relevanz. Übertragbar bedeutet dies eben eine Selektion resistenter Tumorzellen unter Therapie, die sich als Tumorresiduen, Tumorrezidiv oder Metastasen klinisch manifestieren könnten. Denkbar ist, dass diese klonale Selektion *in vivo* unter Therapie frühzeitig erkannt werden könnten und so zu direkten therapeutischen Konsequenzen führen. Eine Rolle könnte dabei z. B. die Einzelzellanalyse der Tumorzellen spielen [146].

Obwohl die HDAC2 negativen Zellen in den vorangegangenen Untersuchungen ebenfalls eine geringere Vulnerabilität gegenüber OX zeigten, konnte die Langzeitbehandlung mit OX dies nicht weiter bestätigen. Mit weniger als 1 % negativer Zellen der überlebenden Zellpopulation führt die 14-tägige Behandlung mit niedrig dosiertem OX zu einer statistisch signifikanten Erniedrigung der HDAC2 negativen Zellen. Dementsprechend scheinen die HDAC2 positiven Zellen intrinsische Überlebensvorteile gegenüber der Langzeitbehandlung von OX zu haben. In Kontrast zueinander stehen also die stärkere Zelltodrate HDAC2 positiver Zelllinien bei einmaliger Behandlung mit OX und die positive Selektion eben dieser HDAC2 positiven Zellen unter längerer OX-Exposition. Eventuell können die HDAC2 negativen Zellen, die von OX induzierten Schäden einmalig besser reparieren als die HDAC2-Wildtyp RKO Zellen. Bei längerfristiger Behandlung wäre es denkbar, dass die HDAC2 positiven Zellen bessere Resistenzmechanismen entwickeln können und so einen Selektionsvorteil gegenüber den HDAC2 negativen Zellen zeigen. Als mögliche Resistenzmechanismen wäre beispielsweise eine verringerte intrazelluläre Aufnahme oder ein effizienterer Efflux von OX denkbar [137]. Um diese Hypothese zu untersuchen, könnte man in nachfolgenden Untersuchungen beispielsweise die OX-Konzentration in HDAC2 positiven und negativen Zellen vergleichen oder aber die Proteinlevel von Proteinpumpen, die In- und Efflux von OX steuern, untersuchen. Außerdem könnte ein exakterer zeitlicher Zusammenhang unserer Beobachtungen weitere Hinweise auf die kausalen Vorgänge liefern. Dazu wäre ein Versuchsaufbau mit mehreren Endpunkten sinnvoll, der Rückschlüsse auf den zeitlichen Rahmen des veränderten Expressionsmusters von HDAC2 liefert.

Als möglichen Bias unserer Ergebnisse muss bedacht werden, dass die Zelldichte nach 14-tägiger 5-FU Behandlung deutlich geringer ist als nach vergleichbarer OX Behandlung. Die differente Zelldichte liegt an unterschiedlich starker Zytotoxizität von 5-FU und OX auf die RKO Zellen. Eine unterschiedliche Zelldichte könnte die von uns beobachteten Ergebnisse mitbeeinflussen. Um diesen Bias sicher auszuschließen, müsste man die Dosierung von 5-FU und OX so anpassen, dass die Zelldichte nach 14 Tagen vergleichbar wäre. Allerdings beeinflusst auch die Konzentration der Inhibitoren die Ergebnisse wesentlich. Zudem würden weitere Langzeitversuche mit den verschiedenen RKO-Zelllinien helfen, die Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses von HDAC2 zu validieren. Bestätigen die anderen RKO-Zelllinien unsere Ergebnisse oder ergeben sich neue Aspekte zur Bewertung unserer Beobachtung?

Ob diese präklinischen Ergebnisse in die Klinik übertragbar sind und dort in Zukunft einen Beitrag zur individualisierten Tumorthherapie leisten können, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

## 6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, welchen Einfluss die Expression der HDAC2 auf das Verhalten der Karzinomzelllinie RKO nimmt. Dabei wurde insbesondere das Verhalten der verschiedenen Zelllinien unter chemotherapeutischer Behandlung beobachtet. Verwendet wurden die bereits etablierten Zelllinien RKO-ATCC und RKO-ES, sowie die im Verlauf dieser Arbeit aus der Mutterzelllinie RKO-ATCC entstandenen Subklone RKO HDAC2 positiv und RKO HDAC2 negativ. In den Untersuchungen zeigt die *RKO-ATCC* Zelllinie in der Immunfluoreszenz einzelne Subklone (durchschnittlich 1,7 % der Zellen) ohne HDAC2 Expression. Die RKO-ATCC Zelllinie ist damit eine für HDAC2 heterogene Karzinomzelllinie. Mittels Einzelzellselektion konnte jeweils aus einem HDAC2 positivem und einem HDAC2 negativem Zellklon eine neue Zelllinie etabliert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass der HDAC2 Status das Wachstumsverhalten und die Zellteilung unter idealen Kulturbedingungen nicht beeinflusst.

Das Therapieansprechen auf die beiden Erstlinien-Chemotherapeutika 5-FU und OX unterscheidet sich in den RKO Zellen abhängig von ihrem HDAC2 Status signifikant. 5-FU führt in überwiegend HDAC2 positiven Zellen in der Zellzyklusanalyse zu statistisch signifikant höheren SubG1-Anteilen. Auch die Zelltodinduktion ist in HDAC2 positiven Zelllinien signifikant stärker. Es konnte damit gezeigt werden, dass der Verlust von HDAC2 bzw. die fehlende Expression einen Selektionsvorteil gegenüber der Wirksamkeit von 5-FU bietet. Dieser Selektionsvorteil zeigte sich ebenfalls unter längerfristiger Behandlung mit niedrig dosiertem 5-FU. Wir konnten zeigen, dass sich der Anteil an HDAC2 negativen Zellen unter 14-tägiger Behandlung mit 5-FU in der RKO-ATCC Zelllinie signifikant (durchschnittlich 10,67 % aller Zellen) erhöht.

Im Kontrast dazu zeigen die HDAC2 negativen Zelllinien in der einmaligen Behandlung mit OX ebenfalls signifikant geringere SubG1-Anteile und weniger Zelltodinduktion, obwohl sich unter längerfristiger Behandlung mit OX ein statistisch signifikant niedriger Anteil an HDAC2 negativen Zellen innerhalb der RKO-ATCC Zelllinie zeigt (durchschnittlich 0,63 % aller Zellen). Möglicherweise entsteht dieser Unterschied durch unterschiedliche intrazelluläre Vorgänge bei einmaliger oder längerfristiger Behandlung.

Die Behandlung mit den neueren HDAC Inhibitoren Entinostat (MS-275) und Panobinostat (LBH-589) zeigt hingegen keinen Unterschied zwischen den verschiedenen RKO Zelllinien. Die Ergebnisse lassen keine Abhängigkeit der Wirksamkeit der HDACi vom HDAC2 Status zu.

Damit eignet sich HDAC2 nicht als Prädiktor für eine zukünftige *targeted* Therapie mit HDACi. Jedoch könnte der HDAC2 Status von kolorektalen Karzinomen in Zukunft ein prognostischer Faktor werden, der die Wirksamkeit der Chemotherapie mitbeeinflusst. Zeigen sich die Ergebnisse dieser Arbeit auch in anderen Karzinomzelllinien oder gar in klinischen Studien an humanen

Tumorpräparaten könnte der HDAC2 Status ein mitbestimmender Faktor auf dem Weg zu einer individuellen Tumorthherapie werden.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Peluso, G., et al., *Current Tissue Molecular Markers in Colorectal Cancer: A Literature Review*. Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 2605628.
2. Punt, C.J., M. Koopman, and L. Vermeulen, *From tumour heterogeneity to advances in precision treatment of colorectal cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2017. **14**(4): p. 235-246.
3. Misale, S., et al., *Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer*. Nature, 2012. **486**(7404): p. 532-6.
4. Normanno, N., et al., *Heterogeneity of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in metastatic colorectal cancer and potential effects on therapy in the CAPRI GOIM trial*. Annals of Oncology, 2015. **26**(8): p. 1710-1714.
5. Yates, L.R., et al., *Subclonal diversification of primary breast cancer revealed by multiregion sequencing*. Nature Medicine, 2015. **21**(7): p. 751-759.
6. Soverini, S., et al., *Implications of BCR-ABL1 kinase domain-mediated resistance in chronic myeloid leukemia*. Leuk Res, 2014. **38**(1): p. 10-20.
7. Schmitt, M.W., L.A. Loeb, and J.J. Salk, *The influence of subclonal resistance mutations on targeted cancer therapy*. Nature reviews. Clinical oncology, 2016. **13**(6): p. 335-347.
8. Kramer, O.H., *HDAC2: a critical factor in health and disease*. Trends Pharmacol Sci, 2009. **30**(12): p. 647-55.
9. Heinzl, T. and O. Krämer, *Pharmacodynamic markers for histone deacetylase inhibitor development*. Vol. 4. 2007. 277-283.
10. Shussman, N. and S.D. Wexner, *Colorectal polyps and polyposis syndromes*. Gastroenterol Rep (Oxf), 2014. **2**(1): p. 1-15.
11. Marley, A.R. and H. Nan, *Epidemiology of colorectal cancer*. International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics, 2016. **7**(3): p. 105-114.
12. World Health Organization. *Cancer Key facts*. 2018, February 01; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
13. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), *Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe*. 2017, December 06: p. 36-39.
14. Siegel, R., et al., *Cancer treatment and survivorship statistics, 2012*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2012. **62**(4): p. 220-241.
15. Brenner, H., M. Kloor, and C.P. Pox, *Colorectal cancer*. The Lancet, 2014. **383**(9927): p. 1490-1502.
16. Torre, L.A., et al., *Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2016. **25**(1): p. 16-27.
17. Umezawa, S., et al., *Chemoprevention of colorectal cancer: Past, present, and future*. Cancer Sci, 2019. **110**(10): p. 3018-3026.
18. Moreira, L. and A. Castells, *Surveillance of patients with hereditary gastrointestinal cancer syndromes*. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2016. **30**(6): p. 923-935.
19. Vogelstein, B., et al., *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. N Engl J Med, 1988. **319**(9): p. 525-32.
20. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-767.
21. Katherine B. Geiersbach and Wade S. Samowitz, *Microsatellite Instability and Colorectal Cancer*. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2011. **135**(10): p. 1269-1277.
22. Boland, C.R. and A. Goel, *Microsatellite instability in colorectal cancer*. Gastroenterology, 2010. **138**(6): p. 2073-2087.e3.
23. Popat, S., R. Hubner, and R.S. Houlston, *Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis*. J Clin Oncol, 2005. **23**(3): p. 609-18.
24. Ijspeert, J.E.G., J.P. Medema, and E. Dekker, *Colorectal Neoplasia Pathways: State of the Art*. Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America, 2015. **25**(2): p. 169-182.
25. Colussi, D., et al., *Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(8): p. 16365-16385.
26. Kastrinos, F. and E.M. Stoffel, *History, genetics, and strategies for cancer prevention in Lynch syndrome*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2014. **12**(5): p. 715-27; quiz e41-3.
27. Markowitz, S., et al., *Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability*. Science, 1995. **268**(5215): p. 1336-8.
28. Miyashita, T. and J.C. Reed, *Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene*. Cell, 1995. **80**(2): p. 293-9.
29. Toyota, M., et al., *CpG island methylator phenotype in colorectal cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8681-6.

30. Rajagopalan, H., et al., *Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status*. Nature, 2002. **418**(6901): p. 934.
31. JE, I.J., et al., *Serrated neoplasia-role in colorectal carcinogenesis and clinical implications*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2015. **12**(7): p. 401-9.
32. Muto, T., H.J. Bussey, and B.C. Morson, *The evolution of cancer of the colon and rectum*. Cancer, 1975. **36**(6): p. 2251-70.
33. Edelstein, D.L., et al., *Rapid development of colorectal neoplasia in patients with Lynch syndrome*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2011. **9**(4): p. 340-3.
34. Dagogo-Jack, I. and A.T. Shaw, *Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies*. Nat Rev Clin Oncol, 2018. **15**(2): p. 81-94.
35. Ligtenberg, M.J., et al., *Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1*. Nat Genet, 2009. **41**(1): p. 112-7.
36. Gerlinger, M., et al., *Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing*. N Engl J Med, 2012. **366**(10): p. 883-892.
37. Yu, C., et al., *Discovery of biclonal origin and a novel oncogene SLC12A5 in colon cancer by single-cell sequencing*. Cell Res, 2014. **24**(6): p. 701-12.
38. Wittekind, L.H.S.a.C. *UICC, TNM Classification of Malignant Tumours. 6th Edition*. 2002.
39. Sobin, L.H., *Tnm Classification of Malignant Tumours*. 2009: John Wiley & Sons, Incorporated.
40. Fachgesellschaften, A.d.W.M. *S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom*. 2017, November; November 2017:[Available from: [http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/Kolorektales\\_Karzinom/Version\\_2.0/LL\\_KRK\\_Langversion\\_2.0.pdf](http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Kolorektales_Karzinom/Version_2.0/LL_KRK_Langversion_2.0.pdf).
41. Benson, A.B., 3rd, et al., *Colon Cancer, Version 1.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*. J Natl Compr Canc Netw, 2017. **15**(3): p. 370-398.
42. Sadanandam, A., et al., *A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy*. Nature medicine, 2013. **19**(5): p. 619-625.
43. Hegde, S.R., W. Sun, and J.P. Lynch, *Systemic and targeted therapy for advanced colon cancer*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2008. **2**(1): p. 135-49.
44. Liu, Y., et al., *Cancer drug resistance: Redox resetting renders a way*. Oncotarget, 2015. **7**.
45. Longley, D.B., D.P. Harkin, and P.G. Johnston, *5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 330-8.
46. Wohlhueter, R.M., R.S. McIvor, and P.G. Plagemann, *Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells*. J Cell Physiol, 1980. **104**(3): p. 309-19.
47. Ladner, R.D., *The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy*. Curr Protein Pept Sci, 2001. **2**(4): p. 361-70.
48. Kanamaru, R., et al., *The inhibitory effects of 5-fluorouracil on the metabolism of preribosomal and ribosomal RNA in L-1210 cells in vitro*. Cancer Chemother Pharmacol, 1986. **17**(1): p. 43-6.
49. Santi, D.V., C.S. McHenry, and H. Sommer, *Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate*. Biochemistry, 1974. **13**(3): p. 471-81.
50. Pelley, R.J., *Oxaliplatin: a new agent for colorectal cancer*. Curr Oncol Rep, 2001. **3**(2): p. 147-55.
51. Raymond, E., et al., *Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(3): p. 227-35.
52. Bowden, N.A., *Nucleotide excision repair: Why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy?* Cancer Letters, 2014. **346**(2): p. 163-171.
53. Goodisman, J., et al., *Analysis of cytotoxicities of platinum compounds*. Cancer Chemother Pharmacol, 2006. **57**(2): p. 257-67.
54. Cassidy, J. and J.-L. Misset, *Oxaliplatin-related side effects: Characteristics and management*. Seminars in Oncology, 2002. **29**(5, Supplement 15): p. 11-20.
55. Drott, J., et al., *Oxaliplatin-Induced Neurotoxic Side Effects and Their Impact on Daily Activities: A Longitudinal Study Among Patients With Colorectal Cancer*. Cancer Nurs, 2019. **42**(6): p. E40-e48.
56. Erdem, G.U., et al., *Oxaliplatin-induced acute thrombocytopenia*. J Cancer Res Ther, 2016. **12**(2): p. 509-14.
57. Fink, D., et al., *In Vitro and in Vivo Resistance to Cisplatin in Cells That Have Lost DNA Mismatch Repair*. Cancer Research, 1997. **57**(10): p. 1841-1845.
58. Moreira, L., et al., *Identification of lynch syndrome among patients with colorectal cancer*. JAMA, 2012. **308**(15): p. 1555-1565.
59. Umar, A., et al., *Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 2004. **96**(4): p. 261-268.
60. Jarvinen, H.J., et al., *Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. Gastroenterology, 2000. **118**(5): p. 829-34.

61. Lynch, P., *If aggressive surveillance in hereditary nonpolyposis colorectal cancer is now state of the art, are there any challenges left?* Gastroenterology, 2000. **118**(5): p. 969-71.
62. Vasen, H.F., F.M. Nagengast, and P.M. Khan, *Interval cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome)*. Lancet, 1995. **345**(8958): p. 1183-4.
63. Kim, M.J., et al., *The expression of epithelial mesenchymal transition related factors in human colorectal cancer cell lines*. Korean J Clin Oncol, 2013. **9**(2): p. 160-167.
64. Vilar, E., et al., *Microsatellite instability due to hMLH1 deficiency is associated with increased cytotoxicity to irinotecan in human colorectal cancer cell lines*. British journal of cancer, 2008. **99**(10): p. 1607-1612.
65. Smith, M.L., et al., *Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage*. Oncogene, 1995. **10**(6): p. 1053-9.
66. ATCC® in partnership with LGC Standards. *RKO (ATCC® CRL-2577™)* 2018, May 03; Available from: [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2577.aspx?geo\\_country=de#generalinformation](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2577.aspx?geo_country=de#generalinformation).
67. Barallon, R., et al., *Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2010. **46**(9): p. 727-32.
68. Boyd, D., et al., *Determination of the levels of urokinase and its receptor in human colon carcinoma cell lines*. Cancer Res, 1988. **48**(11): p. 3112-6.
69. Buchwald, M., O.H. Kramer, and T. Heinzel, *HDACi--targets beyond chromatin*. Cancer Lett, 2009. **280**(2): p. 160-7.
70. Baylin, S.B. and P.A. Jones, *A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(10): p. 726-34.
71. Kouzarides, T., *Chromatin Modifications and Their Function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
72. Yang, X.J. and E. Seto, *Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications*. Mol Cell, 2008. **31**(4): p. 449-61.
73. Glozak, M.A. and E. Seto, *Histone deacetylases and cancer*. Oncogene, 2007. **26**(37): p. 5420-32.
74. Falkenberg, K.J. and R.W. Johnstone, *Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders*. Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(9): p. 673-91.
75. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
76. Reichert, N., M.A. Choukrallah, and P. Matthias, *Multiple roles of class I HDACs in proliferation, differentiation, and development*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(13): p. 2173-87.
77. Harms, K.L. and X. Chen, *Histone deacetylase 2 modulates p53 transcriptional activities through regulation of p53-DNA binding activity*. Cancer Res, 2007. **67**(7): p. 3145-52.
78. Ropero, S., et al., *Transforming pathways unleashed by a HDAC2 mutation in human cancer*. Oncogene, 2008. **27**(28): p. 4008-12.
79. Zhu, P., et al., *Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis*. Cancer Cell. **5**(5): p. 455-463.
80. Lutz, L., et al., *Histone modifiers and marks define heterogeneous groups of colorectal carcinomas and affect responses to HDAC inhibitors in vitro*. American journal of cancer research, 2016. **6**(3): p. 664-676.
81. Huang, B.H., et al., *Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1*. Cell Death Differ, 2005. **12**(4): p. 395-404.
82. Bolden, J.E., M.J. Peart, and R.W. Johnstone, *Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors*. Nature Reviews Drug Discovery, 2006. **5**: p. 769.
83. Fedele, P., L. Orlando, and S. Cinieri, *Targeting triple negative breast cancer with histone deacetylase inhibitors*. Expert Opin Investig Drugs, 2017. **26**(11): p. 1199-1206.
84. Lindemann, R.K., B. Gabrielli, and R.W. Johnstone, *Histone-deacetylase inhibitors for the treatment of cancer*. Cell Cycle, 2004. **3**(6): p. 779-88.
85. Prince, H.M., M.J. Bishton, and S.J. Harrison, *Clinical Studies of Histone Deacetylase Inhibitors*. Clinical Cancer Research, 2009. **15**(12): p. 3958-3969.
86. Eckschlagner, T., et al., *Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs*. International Journal of Molecular Sciences, 2017. **18**(7): p. 1414.
87. Bieliauskas, A.V. and M.K.H. Pflum, *Isoform-selective histone deacetylase inhibitors*. Chemical Society reviews, 2008. **37**(7): p. 1402-1413.
88. European Medicines Agency, *Entinostat (MS-275)*. 2018, May 04.
89. Saito, A., et al., *A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(8): p. 4592-4597.
90. ClinicalTrials.gov, U.S.N.L.o.M. *Clinical Trials MS-275 (Entinostat)*. 14.02.2021]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?recrs=&cond=&term=MS-275&cntry=&state=&city=&dist=>



91. Camphausen, K., et al., *Enhancement of xenograft tumor radiosensitivity by the histone deacetylase inhibitor MS-275 and correlation with histone hyperacetylation*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(18 Pt 1): p. 6066-71.
92. Li, H., et al., *Immune regulation by low doses of the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacitidine in common human epithelial cancers*. Oncotarget, 2014. **5**(3): p. 587-98.
93. Bartels, M., et al., *Valproic acid treatment is associated with altered leukocyte subset development*. J Clin Psychopharmacol, 2012. **32**(6): p. 832-4.
94. Tzogani, K., et al., *The European Medicines Agency Review of Panobinostat (Farydak) for the Treatment of Adult Patients with Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma*. Oncologist, 2017.
95. Selleckchem. *Panobinostat (LBH589)*. 2018, May 03; Available from: <http://www.selleckchem.com/products/LBH-589.html>.
96. Agency, E.M. *First HDAC inhibitor for treatment of multiple myeloma recommended for approval in EU* [cited 2015 26.06.]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/news/first-hdac-inhibitor-treatment-multiple-myeloma-recommended-approval-eu>.
97. ClinicalTrials.gov, U.S.N.L.o.M. *Clinical Trials LBH-589 (Panobinostat)*. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?recrs=&cond=&term=lbh-589&cntry=&state=&city=&dist=>.
98. U.S. National Library of Medicine ClinicalTrials.gov. *A Study of PDR001 in Combination With LCL161, Everolimus or Panobinostat*. 2018, February 23; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02890069#contactlocation>.
99. Garpis, N., et al., *Histone Deacetylases as New Therapeutic Targets in Triple-negative Breast Cancer: Progress and Promises*. Cancer Genomics Proteomics, 2017. **14**(5): p. 299-313.
100. Greve, G., et al., *The pan-HDAC inhibitor panobinostat acts as a sensitizer for erlotinib activity in EGFR-mutated and -wildtype non-small cell lung cancer cells*. BMC Cancer, 2015. **15**(1): p. 947.
101. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
102. Nicoletti, I., et al., *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. J Immunol Methods, 1991. **139**(2): p. 271-9.
103. Krishan, A., *Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining*. J Cell Biol, 1975. **66**(1): p. 188-93.
104. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. J Immunol Methods, 1995. **184**(1): p. 39-51.
105. Pfarr, N., K. Specht, and W. Weichert, *Bestimmung molekularer Biomarker in der Behandlung solider Tumoren*. Forum, 2017. **32**(3): p. 222-229.
106. Ludwig, J.A. and J.N. Weinstein, *Biomarkers in Cancer Staging, Prognosis and Treatment Selection*. Nature Reviews Cancer, 2005. **5**(11): p. 845-856.
107. Sveen, A., S. Kopetz, and R.A. Lothe, *Biomarker-guided therapy for colorectal cancer: strength in complexity*. Nat Rev Clin Oncol, 2020. **17**(1): p. 11-32.
108. Marisa, L., et al., *Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value*. PLoS medicine, 2013. **10**(5): p. e1001453-e1001453.
109. Okugawa, Y., W.M. Grady, and A. Goel, *Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers*. Gastroenterology, 2015. **149**(5): p. 1204-1225.e12.
110. Wilson, A.J., et al., *Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer*. J Biol Chem, 2006. **281**(19): p. 13548-58.
111. Ropero, S., et al., *A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition*. Nature Genetics, 2006. **38**(5): p. 566-569.
112. Ree, A.H., S. Folkvord, and K. Flatmark, *HDAC2 deficiency and histone acetylation*. Nat Genet, 2008. **40**(7): p. 812-3; author reply 813.
113. Garcia, M.A., W.J. Nelson, and N. Chavez, *Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2018. **10**(4): p. a029181.
114. Milazzo, G., et al., *Histone Deacetylases (HDACs): Evolution, Specificity, Role in Transcriptional Complexes, and Pharmacological Actionability*. Genes, 2020. **11**(5): p. 556.
115. Lai, A., et al., *RBP1 recruits the mSIN3-histone deacetylase complex to the pocket of retinoblastoma tumor suppressor family proteins found in limited discrete regions of the nucleus at growth arrest*. Molecular and cellular biology, 2001. **21**(8): p. 2918-2932.
116. Telles, E. and E. Seto, *Modulation of cell cycle regulators by HDACs*. Frontiers in bioscience (Scholar edition), 2012. **4**: p. 831-839.
117. Wilting, R.H., et al., *Overlapping functions of Hdac1 and Hdac2 in cell cycle regulation and haematopoiesis*. The EMBO journal, 2010. **29**(15): p. 2586-2597.

118. Lagger, G., et al., *Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression*. The EMBO journal, 2002. **21**(11): p. 2672-2681.
119. Georgakopoulos-Soares, I., et al., *EMT Factors and Metabolic Pathways in Cancer*. Frontiers in oncology, 2020. **10**: p. 499-499.
120. Guarino, M., *Epithelial–mesenchymal transition and tumour invasion*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007. **39**(12): p. 2153-2160.
121. Basu, S., S. Cheriyaundath, and A. Ben-Ze'ev, *Cell-cell adhesion: linking Wnt/ $\beta$ -catenin signaling with partial EMT and stemness traits in tumorigenesis*. F1000Res, 2018. **7**.
122. Gill, S., et al., *Pooled Analysis of Fluorouracil-Based Adjuvant Therapy for Stage II and III Colon Cancer: Who Benefits and by How Much?* Journal of Clinical Oncology, 2004. **22**(10): p. 1797-1806.
123. O'Connor, E.S., et al., *Adjuvant Chemotherapy for Stage II Colon Cancer With Poor Prognostic Features*. Journal of Clinical Oncology, 2011. **29**(25): p. 3381-3388.
124. Dienstmann, R., R. Salazar, and J. Taberero, *Personalizing Colon Cancer Adjuvant Therapy: Selecting Optimal Treatments for Individual Patients*. Journal of Clinical Oncology, 2015. **33**(16): p. 1787-1796.
125. Li, S. and Q. Li, *Cancer stem cells and tumor metastasis (Review)*. Int J Oncol, 2014. **44**(6): p. 1806-12.
126. Zhang, L., et al., *The role of GLI1 for 5-Fu resistance in colorectal cancer*. Cell & Bioscience, 2017. **7**(1): p. 17.
127. Denise, C., et al., *5-fluorouracil resistant colon cancer cells are addicted to OXPHOS to survive and enhance stem-like traits*. Oncotarget, 2015. **6**(39): p. 41706-41721.
128. Vaiopoulos, A.G., et al., *Colorectal Cancer Stem Cells*. STEM CELLS, 2012. **30**(3): p. 363-371.
129. Paschall, A.V., et al., *CD133+CD24lo defines a 5-Fluorouracil-resistant colon cancer stem cell-like phenotype*. Oncotarget, 2016. **7**(48): p. 78698-78712.
130. Ahn, J.Y., et al., *Acquired resistance to 5-fluorouracil via HSP90/Src-mediated increase in thymidylate synthase expression in colon cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(32): p. 32622-33.
131. Kang, K.A., et al., *Interaction of DNA demethylase and histone methyltransferase upregulates Nrf2 in 5-fluorouracil-resistant colon cancer cells*. Oncotarget, 2016. **7**(26): p. 40594-40620.
132. Zaanan, A. and J. Taieb, *[Predictive and prognostic value of MSI phenotype in adjuvant colon cancer: Who and how to treat?]*. Bull Cancer, 2019. **106**(2): p. 129-136.
133. Stein, A. and D. Arnold, *Oxaliplatin: a review of approved uses*. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2012. **13**(1): p. 125-137.
134. Louafi, S., et al., *Gemcitabine plus oxaliplatin (GEMOX) in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC)*. Cancer, 2007. **109**(7): p. 1384-1390.
135. Poorebrahim, M., et al., *Identification of candidate genes and miRNAs for sensitizing resistant colorectal cancer cells to oxaliplatin and irinotecan*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2020. **85**(1): p. 153-171.
136. Liu, H.-F., H.-C. Hu, and J.-I. Chao, *Oxaliplatin down-regulates survivin by p38 MAP kinase and proteasome in human colon cancer cells*. Chemico-Biological Interactions, 2010. **188**(3): p. 535-545.
137. Noordhuis, P., et al., *Coexisting Molecular Determinants of Acquired Oxaliplatin Resistance in Human Colorectal and Ovarian Cancer Cell Lines*. International journal of molecular sciences, 2019. **20**(15): p. 3619.
138. Gourdiere, I., et al., *Oxaliplatin-induced mitochondrial apoptotic response of colon carcinoma cells does not require nuclear DNA*. Oncogene, 2004. **23**(45): p. 7449-57.
139. Kashiwagi, E., et al., *Enhanced expression of nuclear factor I/B in oxaliplatin-resistant human cancer cell lines*. Cancer Science, 2011. **102**(2): p. 382-386.
140. Marks, P.A. and X. Jiang, *Histone deacetylase inhibitors in programmed cell death and cancer therapy*. Cell Cycle, 2005. **4**(4): p. 549-51.
141. Lee, S.C., et al., *Low-dose combinations of LBH589 and TRAIL can overcome TRAIL-resistance in colon cancer cell lines*. Anticancer Res, 2011. **31**(10): p. 3385-94.
142. Terranova-Barberio, M., et al., *Synergistic antitumor interaction between valproic acid, capecitabine and radiotherapy in colorectal cancer: critical role of p53*. J Exp Clin Cancer Res, 2017. **36**(1): p. 177.
143. Burrell, R.A. and C. Swanton, *Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance*. Molecular oncology, 2014. **8**(6): p. 1095-1111.
144. Findlay, J.M., et al., *Differential clonal evolution in oesophageal cancers in response to neo-adjuvant chemotherapy*. Nature communications, 2016. **7**: p. 11111-11111.
145. Diaz, L.A., Jr., et al., *The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers*. Nature, 2012. **486**(7404): p. 537-40.
146. Saadatpour, A., et al., *Single-Cell Analysis in Cancer Genomics*. Trends in genetics : TIG, 2015. **31**(10): p. 576-586.

# 8 Anhang

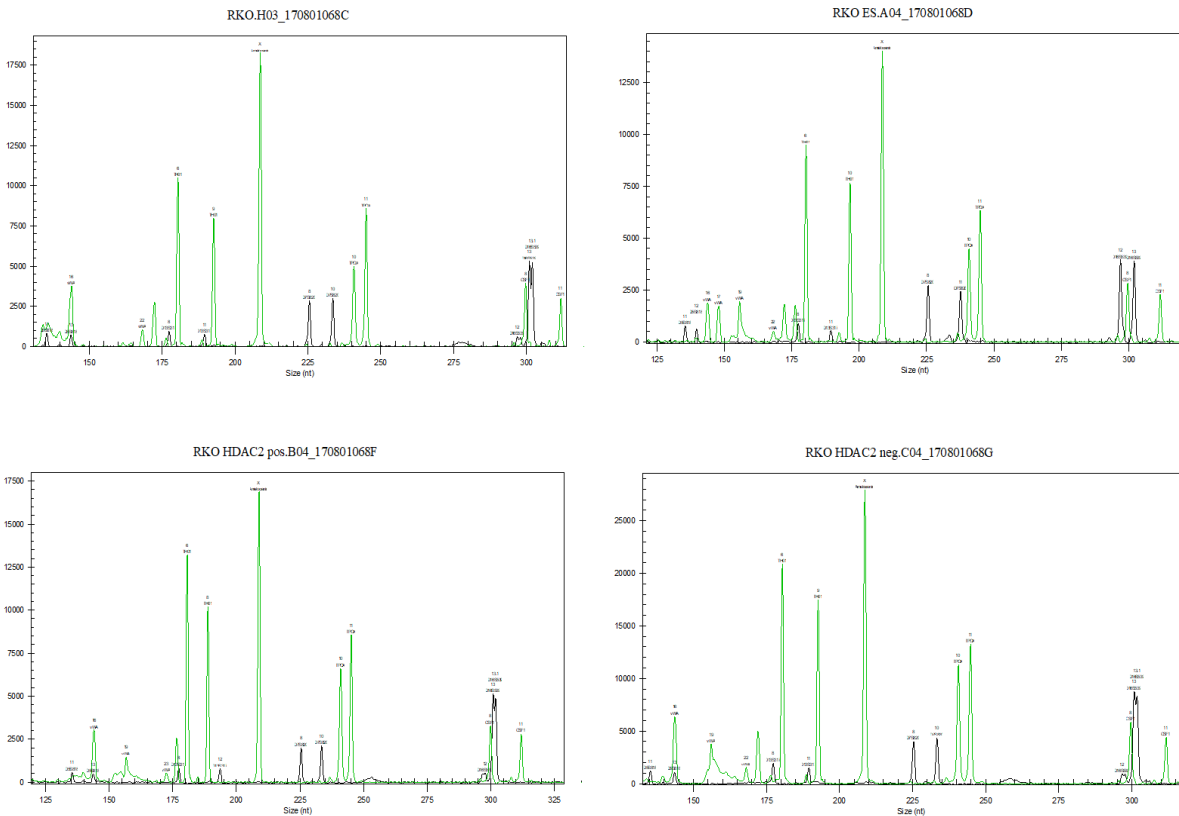
## 8.1 Anhang Abbildungen

	Cell line	Date	D5	D5'	D13	D13'	D7	D7'	D16	D16'	vWA	vWA'	TH01	TH01'	TPOX	TPOX'	CSF1	CSF1'	Amel	Amel'	Date Animal-PCR	M	R	CH	SH	MMR-Status	
	ATCC(CRL-2577)	RKO	02.09.2011	11	13	8	11	8	10	12	13	15/16	17	6	10	11	11	8	10	X	X						MSL-H
	Krämer, Universitätsmedizin Mainz; Institut für Toxikologie	RKO	31.07.2017	11	13	8	11	8	10	12/13	13,1	16	22/23	6	9	10	11	8	11	X	X	31.07.2017	-	-	-	-	MSL-H
	Krämer, Universitätsmedizin Mainz; Institut für Toxikologie	RKO ES	31.07.2017	11	12	8	11	8	11	12	13	16/17	19/22/23	6	10	10	11	8	11	X	X	31.07.2017	-	-	-	-	MSL-H
	Krämer, Universitätsmedizin Mainz; Institut für Toxikologie	RKO HDAC2 pos	31.07.2017	11	13	8	12	8	10	12/13	13,1	16	19/23/24	6	8	10	11	8	11	X	X	31.07.2017	-	-	-	-	MSL-H
	Krämer, Universitätsmedizin Mainz; Institut für Toxikologie	RKO HDAC2 neg	31.07.2017	11	13	8	11	8	10	12/13	13,1	16	19/22/23	6	9	10	11	8	11	X	X	31.07.2017	-	-	-	-	MSL-H

STR-profile of reference  
 STR-profile of analysed sample

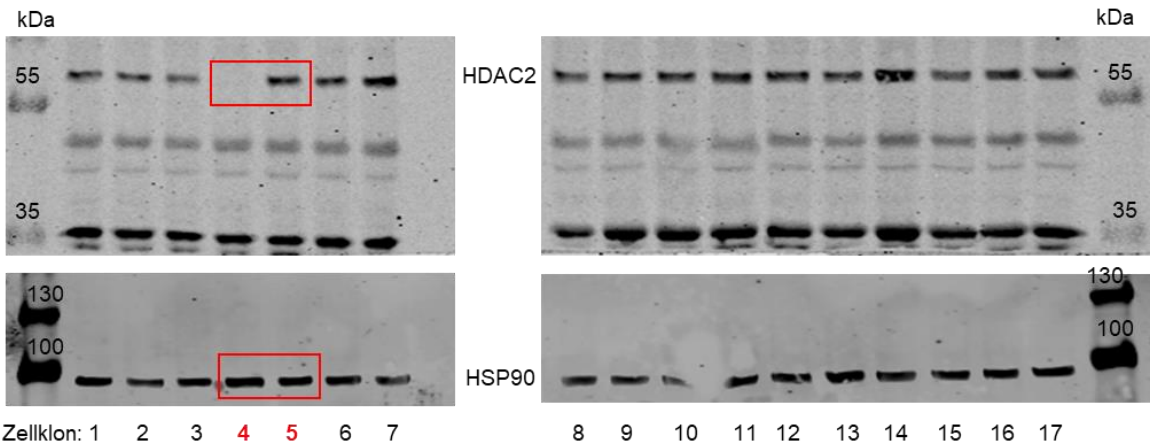
### Abbildung A1 Authentifizierung der RKO Zelllinien durch das Leibniz-Institut DSMZ

DNA-Fingerprinting Analyse der Zelllinien RKO-ATCC (RKO), RKO-ES (RKO ES), RKO HDAC2 positiv (RKO HDAC2 pos) und RKO HDAC2 negativ (RKO HDAC2 neg) unter Verwendung von 8 unterschiedlichen, stark polymorphen STR-Loci. Die generierten STR-Profile wurden mit der Referenzzelllinie RKO (ATCC (CRL-2577)) und den Informationen der Zelldatenbanken ATCC (USA), JCRB (Japan), KCLB (Korea) und DSMZ (Deutschland) verglichen und als RKO Zellkultur identifiziert. Die Analyse wurde vom Leibniz-Institut DSMZ (Braunschweig, Deutschland) durchgeführt. Die Proben wurden zusätzlich negativ auf mitochondriale DNA von Mäusen (M), Ratten (R), chinesischen (CH) und syrischen (SH) Hamstern getestet. Zuletzt wurde die MSI bezüglich des MMR-Status übereinstimmend untersucht. Durchgeführt wurde die Analyse durch das Leibniz-Institut DSMZ.



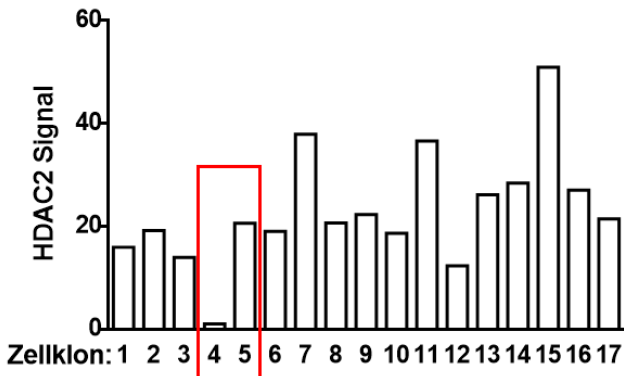
### Abbildung A2 STR-Elektrogramme des Leibniz-Institut DSMZ

STR-Elektrogramme der DNA Fingerprinting Analyse der RKO-ES (RKO ES.A04\_170801068D), RKO-ATCC (RKO.H03\_170801068C), RKO HDAC2 positiv (RKO HDAC2 pos.B04\_170801068F) und RKO HDAC2 negativ (RKO HFAC2 neg.C04\_170801068G) des Leibniz-Institut DSMZ (Braunschweig, Deutschland).



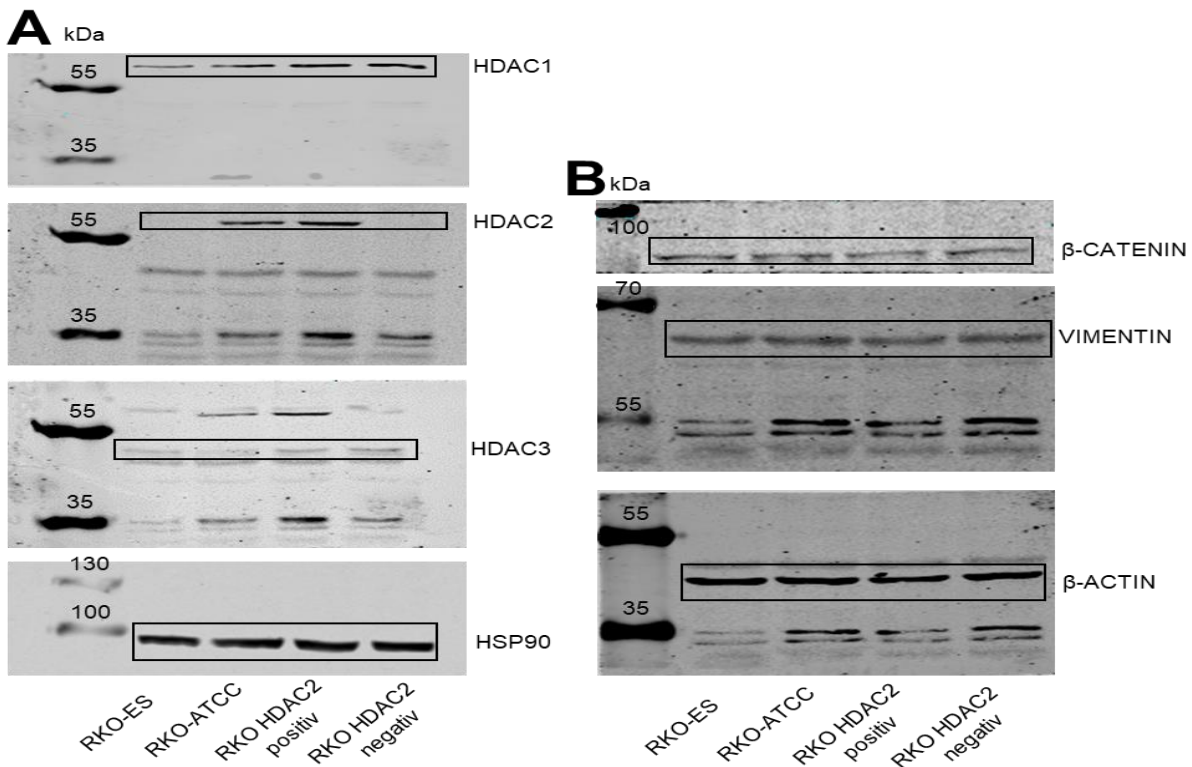
**Abbildung A3 Vollständiger Western Blot der per Einzelzellselektion entstandenen Zellklone**

Vollständiger Western Blot für HDAC2 der 17 durch Einzelzellselektion aus der Ursprungszelllinie RKO-ATCC entstandenen Zellklone. HSP90 wurde als Ladekontrolle verwendet. Die rot markierten Banden zeigen die beiden Zellklone, Nr. 4 und 5, die später als neu etablierte Zelllinien Verwendung fanden.



**Abbildung A4 HDAC2 Signal der Western Blot Analyse aller 17 Einzelzellklone**

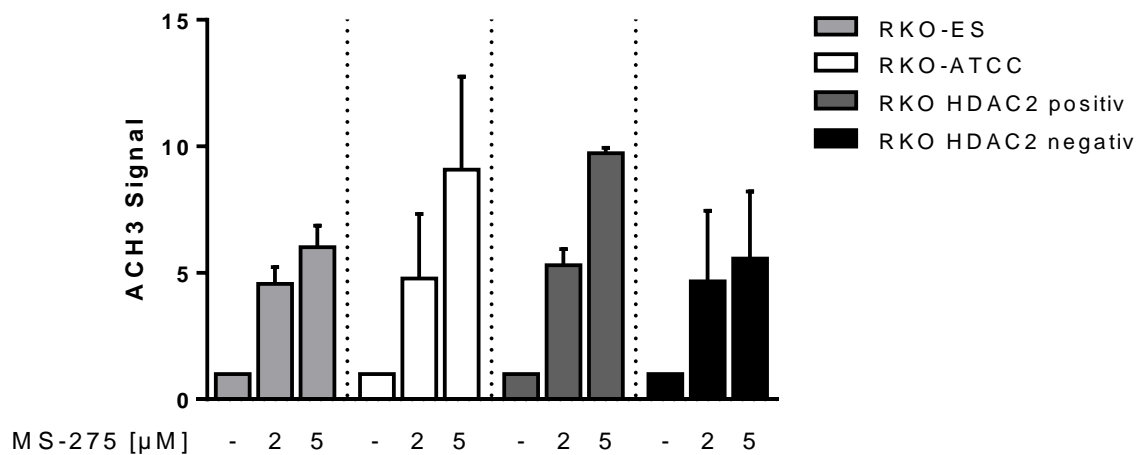
Dargestellt ist das HDAC2 Signal normiert zur HSP90 Ladekontrolle für alle 17 Einzelzellklone. Das geringste Signal (Zellklon Nr. 4) wurde zur besseren Vergleichbarkeit mit 1 gleichgesetzt. Die beiden rot markierten Zellklone Nr. 4 und Nr. 5 wurden als neue Zelllinien *RKO HDAC2 positiv* und *RKO HDAC2 negativ* etabliert.



**Abbildung A5 Ungeschnittene Western Blots der vier RKO Zelllinien**

**A:** Ungeschnittener Western Blot der Zelllinien RKO-ES, RKO-ATCC, RKO HDAC2 positiv und RKO HDAC2 negativ für die Proteine HDAC1-3. HSP90 wurde als Ladekontrolle verwendet. Markiert sind die im Ergebnisteil dargestellten Bereiche.

**B:** Ungeschnittener Western Blot der vier RKO-Zelllinien für die Strukturproteine  $\beta$ -CATENIN und VIMENTIN.  $\beta$ -ACTIN wurde als Ladekontrolle verwendet. Markiert sind die entsprechenden Proteinbanden.



**Abbildung A6 Einfluss der Behandlung mit MS-275 auf das ACH3 Signal**

Die Abbildung zeigt das zur Ladekontrolle HSP90 normierte ACH3 Signal der Western Blot Analyse der vier RKO Zelllinien für je eine unbehandelte Kontrolle und die Behandlung mit 2  $\mu$ M und 5  $\mu$ M MS-275. Das ACH3 Signal der unbehandelten Kontrolle wurde mit 1 gleichgesetzt, nach Behandlung mit MS-275 zeigt sich eine n-fache Signalinduktion bezogen auf die jeweilige Kontrollprobe. Dargestellt sind Mittelwerte mit SD aus n = 2 unabhängigen Versuchen.

## 8.2 Anhang Tabellen

	Zellen gesamt	HDAC2 positiv	HDAC2 negativ
n = 1	671	657	14
n = 2	726	717	9
n = 3	728	715	13
<b>Mittelwert</b>	<b>708,33</b>	<b>696,33</b>	<b>12</b>
<b>Mittelwert (%)</b>	<b>100,00</b>	<b>98,30</b>	<b>1,70</b>
<b>SD (%)</b>		<b>0,35</b>	<b>0,35</b>

**Tabelle A1 Verhältnis HDAC2 positiven/negativen Zellen der RKO-ATCC-Zelllinie**

Dargestellt sind die absoluten Zahlen der gezählten Zellen in der Immunfluoreszenz für HDAC2 der Zelllinie RKO-ATCC für n = 3 unabhängige Versuche. Zudem ist als Mittelwert das prozentuale Verhältnis zwischen HDAC2 positiven und negativen Zellen inklusive Standardabweichung dargestellt.

Zellzyklusphase	Vergleich SubG1	p-Wert
<b>SubG1</b>	RKO-ES vs. RKO-ATCC	> 0,9999
	RKO-ES vs. RKO HDAC2 positiv	> 0,9999
	RKO-ES vs. RKO HDAC2 negativ	0,9987
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 positiv	> 0,9999
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 negativ	0,9991
	RKO HDAC2 positiv vs. RKO HDAC2 negativ	0,9991
<b>G1</b>	<b>RKO-ES vs. RKO-ATCC</b>	<b>0,0028</b>
	<b>RKO-ES vs. RKO HDAC2 positiv</b>	<b>0,0001</b>
	<b>RKO-ES vs. RKO HDAC2 negativ</b>	<b>0,0012</b>
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 positiv	0,4686
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 negativ	0,9813
	RKO HDAC2 positiv vs. RKO HDAC2 negativ	0,691
<b>S</b>	RKO-ES vs. RKO-ATCC	0,6535
	RKO-ES vs. RKO HDAC2 positiv	0,9994
	RKO-ES vs. RKO HDAC2 negativ	0,0466
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 positiv	0,7213
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 negativ	0,3557
	RKO HDAC2 positiv vs. RKO HDAC2 negativ	0,0586
<b>G2</b>	RKO-ES vs. RKO-ATCC	0,3151
	RKO-ES vs. RKO HDAC2 positiv	0,2744
	RKO-ES vs. RKO HDAC2 negativ	0,0247
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 positiv	0,9997
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 negativ	0,5191
	RKO HDAC2 positiv vs. RKO HDAC2 negativ	0,5743

**Tabelle A2 Zellzyklusanalyse unbehandelte Zelllinien**

Statistische Auswertung mittels One-way ANOVA und Post ad Hoc Test nach Tukey der Zellzyklusanalyse der unbehandelten Zelllinien. Statistisch signifikante Unterschiede sind fett hervorgehoben.

Behandlung	Vergleich SubG1	p-Wert
Kontrolle	RKO-ES vs. RKO-ATCC	0,9998
5 µM 5-FU	RKO-ES vs. RKO-ATCC	< 0,0001
10 µM 5-FU	RKO-ES vs. RKO-ATCC	< 0,0001
20 µM 5-FU	RKO-ES vs. RKO-ATCC	< 0,0001

**Tabelle A3 Zelltodanalyse nach Behandlung mit 5-FU zur Dosisfindung**

Statistische Auswertung mittels One-way-ANOVA und Post ad Hoc Test nach Tukey der Zelltodanalyse zwischen den unbehandelten RKO-ES und RKO-ATCC Zellen, sowie für beide Zelllinien nach Behandlung mit 5 µM, 10 µM und 20 µM 5-FU jeweils nach 48-stündiger Behandlung.

Behandlung	Zelllinie	Signal	TS		p-Wert
		inhibiert (%)	aktiv (%)		
Kontrolle	RKO-ES	0	100	RKO-ES vs. RKO-ATCC	> 0,9999
	RKO-ATCC	0	100		
5 µM 5-FU	RKO-ES	55,76	44,23	RKO-ES vs. RKO-ATCC	0,9996
	RKO-ATCC	54,37	45,63		
10 µM 5-FU	RKO-ES	58,52	41,47	RKO-ES vs. RKO-ATCC	> 0,9999
	RKO-ATCC	58,97	41,02		
20 µM 5-FU	RKO-ES	53,9	46,1	RKO-ES vs. RKO-ATCC	0,6901
	RKO-ATCC	58,74	41,26		

**Tabelle A4 Verteilung des TS Signals in Abhängigkeit von der Behandlung mit 5-FU**

Die Tabelle zeigt die prozentuale Verteilung des TS Signal ermittelt aus der Western Blot Analyse jeweils für unbehandelte Kontrolle und die Behandlungen mit den verschiedenen Konzentrationen von 5-FU (5 µM, 10 µM und 20 µM) der beiden Zelllinien *RKO-ATCC* und *RKO-ES*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n = 3 unabhängigen Versuchen. Das Proteinsignal des Enzyms TS unterteilt sich dabei in das inhibierte, Komplexgebundene Enzym und das freie, aktive Enzym. Dargestellt ist zusätzlich der p-Wert der statistischen Auswertung mittels One-Way-ANOVA und Post ad Hoc Test nach Tukey.

Behandlung	Vergleich SubG1	Zeit	p-Wert
------------	-----------------	------	--------

<b>Behandelte Zellen / unbehandelte Kontrolle</b>	RKO-ES	24 h	> 0,9999	
		<b>48 h</b>	<b>0,0046</b>	
	RKO-ATCC	24 h	0,9919	
		<b>48 h</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	
	RKO HDAC2 positiv	24 h	0,9829	
		<b>48 h</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	
	RKO HDAC2 negativ	24 h	> 0,9999	
		<b>48 h</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	
<b>Kontrolle</b>	RKO-ES vs. RKO-ATCC	24 h	> 0,9999	
		48 h	> 0,9999	
	RKO-ES vs. RKO HDAC2 positiv	24 h	> 0,9999	
		48 h	> 0,9999	
	RKO-ES vs. RKO HDAC2 negativ	24 h	> 0,9999	
		48 h	> 0,9999	
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 positiv	24 h	> 0,9999	
		48 h	> 0,9999	
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 negativ	24 h	> 0,9999	
		48 h	> 0,9999	
	RKO HDAC2 positiv vs. RKO HDAC2 negativ	24 h	> 0,9999	
		48 h	> 0,9999	
	<b>5 µM 5-FU</b>	RKO-ES vs. RKO-ATCC	24 h	0,9985
			<b>48 h</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
		RKO-ES vs. RKO HDAC2 positiv	24 h	0,9995
			<b>48 h</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
RKO-ES vs. RKO HDAC2 negativ		24 h	> 0,9999	
		48 h	<b>0,0471</b>	
RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 positiv		24 h	> 0,9999	
		48 h	> 0,9999	
RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 negativ		24 h	0,9995	
		<b>48 h</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	
RKO HDAC2 positiv vs. RKO HDAC2 negativ		24 h	0,9999	
		<b>48 h</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	

**Tabelle A5 Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit 5-FU**

Statistische Auswertung mittels One-way-ANOVA und Post ad Hoc Test nach Tukey des SubG1 Anteils der Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit 5 µM 5-FU.

Behandlung	Zelltodphase		Zeit	p-Wert
------------	--------------	--	------	--------



<b>5 µM 5-FU</b>	<b>Frühe Apoptose</b>	RKO-ES vs. RKO-ATCC	24 h	0,0523		
			48 h	0,2481		
		RKO-ES vs. RKO HDAC2 positiv	24 h	0,9723		
			48 h	<b>0,0003</b>		
		RKO-ES vs. RKO HDAC2 negativ	24 h	0,9997		
			48 h	0,2255		
		RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 positiv	24 h	0,5043		
			48 h	0,1615		
		RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 negativ	24 h	<b>0,0097</b>		
			48 h	> 0,9999		
		RKO HDAC2 positiv vs. RKO HDAC2 negativ	24 h	0,6678		
			48 h	0,1789		
			<b>Späte Apoptose /Nekrose</b>	RKO-ES vs. RKO-ATCC	24 h	0,7159
					48 h	<b>&lt; 0,0001</b>
RKO-ES vs. RKO HDAC2 positiv	24 h			> 0,9999		
	48 h			<b>0,0094</b>		
RKO-ES vs. RKO HDAC2 negativ	24 h			> 0,9999		
	48 h			<b>0,0174</b>		
RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 negativ	24 h			0,8247		
	48 h			<b>0,0342</b>		
RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 negativ	24 h			0,6553		
	48 h			<b>0,0188</b>		
RKO HDAC2 positiv vs. RKO HDAC2 negativ	24 h			> 0,9999		
	48 h			> 0,9999		

**Tabelle A6 Zelltodanalyse nach Behandlung mit 5-FU**

Statistische Auswertung mittels One-way-ANOVA und Post ad Hoc Test nach Tukey der Zelltodfraktionen nach Behandlung mit 5 µM 5-FU.

<b>Behandlung</b>	<b>Vergleich SubG1</b>	<b>Zeit</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Kontrolle</b>	RKO-ES vs. RKO-ATCC	24 h	> 0,9999
		48 h	> 0,9999
	RKO-ES vs. RKO HDAC2 positiv	24 h	> 0,9999
		48 h	> 0,9999
	RKO-ES vs. RKO HDAC2 negativ	24 h	> 0,9999
		48 h	0,987
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 positiv	24 h	> 0,9999
		48 h	> 0,9999
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 negativ	24 h	0,9999
		48 h	0,9272
	RKO HDAC2 positiv vs. RKO HDAC2 negativ	24 h	0,9994
		48 h	0,9531

<b>10 µM OX</b>	RKO-ES vs. RKO-ATCC	24 h	> 0,9999
		48 h	< 0,0001
	RKO-ES vs. RKO HDAC2 positiv	24 h	> 0,9999
		48 h	0,7683
	RKO-ES vs. RKO HDAC2 negativ	24 h	0,9997
		48 h	0,9803
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 positiv	24 h	0,999
		48 h	0,0052
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 negativ	24 h	> 0,9999
		48 h	0,001
	RKO HDAC2 positiv vs. RKO HDAC2 negativ	24 h	0,9943
		48 h	> 0,9999

**Tabelle A7 Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit Oxaliplatin**

Statistische Auswertung mittels One-way-ANOVA und Post ad Hoc Test nach Tukey des SubG1 Anteils der Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit 10 µM Oxaliplatin.

Behandlung	Zelltodphase		Zeit	p-Wert		
<b>10 µM OX</b>	<b>Frühe Apoptose</b>	RKO-ES vs. RKO-ATCC	24 h	0,994		
			48 h	0,6718		
		RKO-ES vs. RKO HDAC2 positiv	24 h	0,9946		
			48 h	0,1478		
		RKO-ES vs. RKO HDAC2 negativ	24 h	0,9987		
			48 h	> 0,9999		
		RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 positiv	24 h	0,6267		
			48 h	0,9946		
		RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 negativ	24 h	0,7242		
			48 h	0,8193		
		RKO HDAC2 positiv vs. RKO HDAC2 negativ	24 h	> 0,9999		
			48 h	0,2361		
			<b>Späte Apoptose /Nekrose</b>	RKO-ES vs. RKO-ATCC	24 h	0,9923
					48 h	0,0008
RKO-ES vs. RKO HDAC2 positiv	24 h			0,9084		
	48 h			0,0166		
RKO-ES vs. RKO HDAC2 negativ	24 h			0,9845		
	48 h			0,0733		
RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 positiv	24 h			> 0,9999		
	48 h			0,9716		
RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 negativ	24 h			> 0,9999		
	48 h			0,7063		
RKO HDAC2 positiv vs. RKO HDAC2 negativ	24 h			> 0,9999		
	48 h			0,9999		

**Tabelle A8 Zelltodanalyse nach Behandlung mit Oxaliplatin**

Statistische Auswertung mittels One-way-ANOVA und Post ad Hoc Test nach Tukey der Zelltodfraktionen nach Behandlung mit 10 µM OX.

Behandlung	Vergleich SubG1	p-Wert
<b>Kontrolle</b>	RKO-ES vs. RKO-ATCC	> 0,9999
	RKO-ES vs. RKO HDAC2 positiv	> 0,9999
	RKO-ES vs. RKO HDAC2 negativ	0,9975
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 positiv	> 0,9999
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 negativ	> 0,9999
	RKO HDAC2 positiv vs. RKO HDAC2 negativ	> 0,9999
<b>2 µM MS-275</b>	RKO-ES vs. RKO-ATCC	> 0,9999
	RKO-ES vs. RKO HDAC2 positiv	> 0,9999
	RKO-ES vs. RKO HDAC2 negativ	> 0,9999
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 positiv	> 0,9999
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 negativ	0,9991
	RKO HDAC2 positiv vs. RKO HDAC2 negativ	> 0,9999
<b>5 µM MS-275</b>	RKO-ES vs. RKO-ATCC	> 0,9999
	RKO-ES vs. RKO HDAC2 positiv	0,3476
	RKO-ES vs. RKO HDAC2 negativ	> 0,9999
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 positiv	0,486
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 negativ	> 0,9999
	RKO HDAC2 positiv vs. RKO HDAC2 negativ	0,3167
<b>30 nM LBH-589</b>	RKO-ES vs. RKO-ATCC	0,7936
	RKO-ES vs. RKO HDAC2 positiv	> 0,9999
	RKO-ES vs. RKO HDAC2 negativ	0,9859
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 positiv	0,9527
	RKO-ATCC vs. RKO HDAC2 negativ	> 0,9999
	RKO HDAC2 positiv vs. RKO HDAC2 negativ	0,9996

**Tabelle A9 Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit MS-275 und LBH-589**

Statistische Auswertung mittels One-way-ANOVA und Post ad Hoc Test nach Tukey des SubG1 Anteils der Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit 2 µM und 5 µM MS-275 sowie 30 nM LBH-589.

	Zellen gesamt	HDAC2 positiv	HDAC2 negativ
n = 1	198	181	17
n = 2	186	165	21
n = 3	478	424	54
<b>Mittelwert</b>	<b>287,33</b>	<b>256,67</b>	<b>30,67</b>
<b>Mittelwert (%)</b>	<b>100</b>	<b>89,33</b>	<b>10,67</b>
<b>SD (%)</b>		<b>1,29</b>	<b>1,29</b>

**Tabelle A10 Verhältnis HDAC2 positiven/negativen Zellen der RKO-ATCC-Zelllinie nach 14-tägiger Behandlung mit 5-FU**

Dargestellt sind die absoluten Zahlen der gezählten Zellen in der Immunfluoreszenz für HDAC2 der Zelllinie RKO-ATCC für n = 3 unabhängige Versuche nach 14-tägiger Behandlung mit 2 µM 5-FU. Zudem ist als Mittelwert das prozentuale Verhältnis zwischen HDAC2 positiven und negativen Zellen inklusive Standardabweichung dargestellt.

	<b>Zellen gesamt</b>	<b>HDAC2 positiv</b>	<b>HDAC2 negativ</b>
n = 1	364	360	4
n = 2	459	458	1
n = 3	455	452	3
<b>Mittelwert</b>	<b>426</b>	<b>423,33</b>	<b>2,67</b>
<b>Mittelwert (%)</b>	<b>100</b>	<b>99,37</b>	<b>0,63</b>
<b>SD (%)</b>		<b>0,94</b>	<b>0,94</b>

**Tabelle A11 Verhältnis HDAC2 positiven/negativen Zellen der RKO-ATCC-Zelllinie nach 14-tägiger Behandlung mit Oxaliplatin**

Dargestellt sind die absoluten Zahlen der gezählten Zellen in der Immunfluoreszenz für HDAC2 der Zelllinie RKO-ATCC für n = 3 unabhängige Versuche nach 14-tägiger Behandlung mit 2 µM OX. Zudem ist als Mittelwert das prozentuale Verhältnis zwischen HDAC2 positiven und negativen Zellen inklusive Standardabweichung dargestellt.

# Danksagung

*Es ist ein lobenswerter Brauch:*

*Wer was Gutes bekommt, der bedankt sich auch.*

Wilhelm Busch, deutscher Humorist, Dichter und Maler (1832-1908)

Mein besonderer Dank gilt [REDACTED] für das Vertrauen und die Unterstützung, die diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Insbesondere gilt mein Dank meiner Betreuerin [REDACTED], die immer ein offenes Ohr für mich hatte und ohne deren Crashkurs in Zellkultur und Laborarbeit diese Arbeit niemals entstanden wäre.

Außerdem möchte ich der gesamten AG [REDACTED] für die tatkräftige Unterstützung, den Einblick in die Wissenschaft und der Einführung in die Laborarbeit danken. sowie dem [REDACTED] [REDACTED] für die Möglichkeit alle Räumlichkeiten, Materialien und Geräte zu verwenden.

Als letztes möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich immer wieder motivieren konnten, dieses Kapitel doch noch abzuschließen und mich tatkräftig darin unterstützt haben.

# Curriculum Vitae

[Redacted text block containing multiple lines of blacked-out information]