

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

**Modulation der replikativen Stressantwort durch Kombinationstherapien mit  
Entinostat in Kolonkarzinomzellen**

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

Vorgelegt von

Irene Mengchu Hauzenberger  
aus Graz

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

[REDACTED]

1. Gutachter:

[REDACTED]

2. Gutachter:

[REDACTED]

3. Gutachter:

[REDACTED]

Tag der Promotion:

06. Dezember 2022

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	3
Tabellenverzeichnis.....	5
1. Einleitung.....	6
2. Literaturdiskussion.....	8
2.1 Pathogenese und Klassifikation des kolorektalen Karzinoms.....	8
2.2 Therapie des kolorektalen Karzinoms.....	11
2.3 Zellzyklus und Checkpoint Regulation.....	14
2.4 Die DNA Schadensantwort.....	17
2.5 Inhibierung von Histondeacetylasen mit MS-275 als therapeutischer Ansatz in kolorektalen Karzinomen.....	20
2.6 Einfluss von PR130 auf die DNA-Schadensantwort.....	21
2.7 Apoptose.....	22
3. Material und Methoden.....	26
3.1 Material.....	26
3.1.1 Chemikalien.....	26
3.1.2 Medium und Zusätze.....	27
3.1.3 Geräte.....	27
3.1.4 Labormaterialien.....	28
3.1.5 Marker.....	29
3.1.6 Puffer und Lösungen.....	29
3.1.7 Primäre Antikörper.....	30
3.1.8 Sekundäre Antikörper.....	31
3.1.9 Zytostatika.....	31
3.1.10 Zelllinien.....	31
3.1.11 Software.....	31
3.2 Methoden.....	32
3.2.1 Auftauen der Zellen und Erhaltungskultur.....	32
3.2.2 Zellaussaat.....	33
3.2.3 Behandlung der Zellen mit Chemotherapeutika.....	33
3.2.4 Herstellung von Gesamtzellextrakten.....	33
3.2.5 Bradford Proteinanalyse.....	34
3.2.6 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	35

3.2.7	Western Blot.....	37
3.2.8	Durchflusszytometrische Analysen.....	38
3.2.8.1	Zellzyklusanalysen.....	39
3.2.8.2	Zelltodmessung mittels AnnexinV-FITC/PI Färbung.....	40
3.2.9	Statistische Analysen.....	41
4.	Ergebnisse.....	42
4.1	Wachstumsverhalten der HCT116 Zelllinien.....	42
4.2	Charakterisierung der Zytostatika Irinotecan, 5-Fluoruracil und Hydroxyurea.....	43
4.2.1	Irinotecan.....	43
4.2.2	5-Fluoruracil.....	47
4.2.3	Hydroxyurea.....	51
4.3	Wirkung von MS-275.....	54
4.4	Zellzyklusanalysen der HCT116 Zelllinien.....	55
4.5	Molekularbiologische Prozesse der Zellzykluskontrolle in HCT116 Zellen.....	64
4.6	Auswirkungen von PR130 auf den Zellzyklus.....	68
5.	Diskussion.....	77
5.1	MS-275 arretiert p21 kompetente HCT116 Zellen in der G1-Phase und p21 defiziente HCT116 Zellen in der G2-Phase.....	77
5.2	Robustheit von HCT116 <sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zellen bei Irinotecan Monotherapie.....	79
5.2.1	Irinotecan mit MS-275 reduziert die inhibitorische Phosphorylierung von CDK1 in HCT116 <sup>WT</sup> Zellen.....	81
5.2.2	WEE1-Inhibitoren als potentielles Kombinationsherapeutikum in p53 oder p21 defizienten Kolonkarzinomen.....	83
5.3	Resistenzen gegenüber 5-FU Monotherapien in HCT116 <sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Zellen.....	84
5.4	Kombinationstherapieansätze in HCT116 Zellen mit 5-FU.....	87
5.5	Geringe Wirkungsunterschiede zwischen den HCT116 Zelllinien in Reaktion auf HU.....	89
5.6	Höhere Effektivität einer Kombinationstherapie mit HU und MS-275 in verschiedenen HCT116 Zelllinien.....	91
5.7	Einfluss von PR130 auf den CDK1 Phosphorylierungsstatus.....	93
5.8	Relevanz des PR130 Status in der antitumoralen Therapie.....	95
6.	Zusammenfassung.....	96
7.	Literaturverzeichnis.....	98
8.	Danksagung.....	112
9.	Curriculum Vitae.....	113

# Abkürzungsverzeichnis

---

<b>%</b>	Prozent
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>5-FU</b>	5-Fluoruracil
<b>ATM</b>	Ataxia teleangiectasia mutated
<b>ATR</b>	Ataxia teleangiectasia mutated and RAD3-related
<b>ATRIP</b>	ATR-interacting protein
<b>BRCA1</b>	Breast cancer 1
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>Cas</b>	CRISPR associated
<b>CDC6</b>	Cell division cycle 6
<b>CDC25</b>	Cell division cycle 25
<b>CDK</b>	Cyclin dependent kinase
<b>CDT1</b>	Chromatin licensing and DNA replication factor 1
<b>CHK1</b>	Checkpoint kinase 1
<b>CHK2</b>	Checkpoint kinase 2
<b>CKI</b>	Cyclin kinase Inhibitor
<b>CRISPR</b>	Clustered regularly interspaced, short palindromic repeats
<b>ctr./ctrl.</b>	Kontrolle
<b>DDR</b>	DNA damage response
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>DNA-PK</b>	DNA-abhängige Proteinkinasen
<b>dNTP</b>	Deoxyribonukleotid
<b>DSB</b>	DNA-Doppelstrangbruch
<b>Ds-DNA</b>	Doppelstrang-DNA
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>FCS</b>	Fetal calf serum
<b>FDA</b>	U.S. Food and Drug Administration
<b>FITC</b>	Fluorescein Isothiocyanat
<b>FOLFOX</b>	Folsäure + 5-Fluoruracil + Oxaliplatin
<b>FOXO1</b>	Forkhead box protein M1
<b>FSC</b>	Forward scatter
<b>γH2AX</b>	pS139-H2AX
<b>h</b>	Stunden
<b>HAT</b>	Histonacetylase
<b>HDAC</b>	Histondeacetylase
<b>HDACi</b>	Histondeacetylase Inhibitor
<b>HR</b>	Homologe Rekombination
<b>HSP90</b>	Heat shock protein 90
<b>HU</b>	Hydroxyurea
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>MCL-1</b>	Myeloid cell leukemia 1
<b>MCM</b>	Minichromosome maintenance (helicase)

<b>MDM2</b>	Murine double minute 2 homolog
<b>MOMP</b>	Mitochondrial outer membrane permeabilization
<b>NAD+</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide
<b>NBS1</b>	Nijmegen breakage syndrome-1
<b>NER</b>	Nucleotide excision repair
<b>NHEJ</b>	Non-homologous end-joining
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline
<b>Pen/Strep</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>PI</b>	Propidium Iodid
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PIKK</b>	Phosphoinositide 3-kinase-related kinase
<b>PLK1</b>	Polo-like kinase 1
<b>PP2A</b>	Protein phosphatase 2A
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>Rnase</b>	Ribonuklease
<b>RPA</b>	Replikationsprotein A
<b>RS</b>	Replikativer Stress
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SD</b>	Standard Deviation
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfat
<b>SDS-PAGE</b>	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
<b>Ser</b>	Serin
<b>SSB</b>	Single strand break
<b>SSC</b>	Side scatter
<b>Ss-DNA</b>	Single stranded DNA
<b>UICC</b>	Union Internationale contre le cancer
<b>WEE1i</b>	WEE1 Inhibitor
<b>WT</b>	Wildtyp

# Abbildungsverzeichnis

---

Abb. 1: Tumorprogression gemäß der Adenom-Karzinom-Sequenz.....	13
Abb. 2: Darstellung der Tumordinfiltration innerhalb der Kolonwand gemäß der TNM Klassifikation.....	15
Abb. 3: Checkpoint und Zellzyklusregulation.....	18
Abb. 4: Regulierung des G2/M-Checkpoints und die zentrale Rolle des Proteins WEE1. Regulierung des S-Phase Checkpoints.....	20
Abb. 5: Extrinsische und Intrinsische Apoptose-Signalweg.....	29
Abb. Abb. 6: Wachstumskurve der verwendeten HCT116 Zelllinien.....	46
Abb. 7: Dosiswirkung von Irinotecan auf die HCT116 Zelllinien.....	48
Abb. 8: Zellzyklusverteilung der mit Irinotecan inkubierten HCT116 Zelllinien.....	49
Abb. 9: Zelltodmessung der mit Irinotecan behandelten HCT116 Zelllinien.....	50
Abb. 10: Dosiswirkung von 5-Fluoruracil auf HCT116 Zelllinien.....	51
Abb. 11: Zellzyklusanalyse der mit 5-Fluoruracil behandelten HCT116 Zelllinien.....	53
Abb. 12: Zelltodmessung der mit 5-Fluoruracil behandelten HCT116 Zelllinien.....	54
Abb. 13: Dosiswirkung von HU auf HCT116 Zelllinien.....	56
Abb. 14: Dosiswirkung von Hydroxyurea auf den Zellzyklus der HCT116 Zelllinien. .	57
Abb. 15: Zelltodmessung der mit Hydroxyurea behandelten HCT116 Zelllinien.....	58
Abb. 16: Effekte von MS-275 auf die Histonacetylierung und den Zellzyklus.....	59
Abb. 17: Zellzyklusanalyse der mittels Kombinationstherapie inkubierten HCT116 Zelllinien nach 24 h.....	61
Abb. 18: Zelltodanalyse der mittels Kombinationstherapie inkubierten Zellen nach 24 h.....	63
Abb. 19: Zelltodanalyse der mittels Kombinationstherapie inkubierten Zellen nach 48 h.....	64
Abb. 20: Zellzyklusanalyse der mittels Kombinationstherapie inkubierten HCT116WT Zellen nach 48 h.....	66
Abb. 21: Prozentualer Vergleich der Zellzyklusphasen in HCT116 <sup>WT</sup> Zellen nach 24 h und 48 h.....	68
Abb. 22: Expression der Zellzyklus Checkpoint Proteine nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Chemotherapieansätzen.....	70

Abb. 23: Reaktion von PR130 auf die Induktion von replikativen Stress in HCT116 Zelllinien.....	74
Abb. 24: Einfluss von PR130 auf den Zellzyklus nach Kombinationstherapie.....	75
Abb. 25: Effekte von PR130 in der Zelltodmessung.....	77
Abb. 26: DNA Schadensantwort in PR130 kompetenten HCT116 <sup>CC9 ctr.</sup> und PR130 defizienten HCT116 <sup>PR130 -/-</sup> .....	79
Abb. 27: Wirkungsmechanismen auf zellulärer Ebene und Klassifikation der HDACi .....	82
Abb. 28: Irinotecan Wirkungsmechanismus.....	84
Abb. 29: Intrazellulärer Wirkungsmechanismus von 5-FU.....	89
Abb. 30: Schematische Darstellung des "Zwei-Punkte-Ansatzes" von 5-FU und MS-275 in der Zelle.....	92
Abb. 31: Wirkmechanismus von Hydroxyurea.....	94



# Tabellenverzeichnis

---

Tab. 1: Vereinfachte Darstellung der UICC Stadieneinteilung des Kolorektalen Karzinoms modifiziert nach Wittekind (2013).....	15
Tab. 2: Kombinationstherapieschemata der Erstlinientherapie in kolorektalen Karzinomen.....	16
Tab. 3: Schema für die Kombinationstherapie.....	38
Tab. 4: Verdünnungsreihe BSA Standard.....	40
Tab. 5: Trenngel Rezept.....	41
Tab. 6: Sammelgel Rezept.....	42

# 1. Einleitung

---

Mit einer Inzidenz von ungefähr 600.000 Neuerkrankungen pro Jahr ist das kolorektale Karzinom der zweithäufigste maligne Tumor der Frau und das dritthäufigste Karzinom des Mannes in Deutschland. Die Pathogenese des Kolonkarzinoms ist komplex und multifaktoriell bedingt, beruht jedoch häufig auf einer Akkumulation genetischer und epigenetischer Mutationen. Insbesondere das *TP53* Gen, welches für den Tumorsuppressor p53 kodiert, und seine Downstream targets, wie der, durch *CDKN1* kodierte, cyclin-abhängiger Kinasen Inhibitor p21, sind häufig von Mutationen betroffen. Diese spielen wichtige Rollen in der Zellzyklusregulation und DNA Schadensantwort und werden in dieser Arbeit näher untersucht.

Auf Grund von Tumorzellmutationen und steigenden Inzidenzraten an Arzneimittelresistenzen ist die moderne Tumorthherapie bemüht neue Substanzen sowie neue Kombinationsbehandlungen in ihre Therapieschemata zu integrieren. Im Rahmen meiner Dissertation befasse ich mich mit der Fragestellung, welche Auswirkung eine Kombinationstherapie der etablierten Chemotherapeutika Irinotecan, 5-Fluorouracil und Hydroxyurea jeweils mit dem kürzlich zugelassenen Klasse I HDAC-Inhibitor Entinostat (MS-275) auf die Kolonkarzinomzellen hat. Hierbei wird vor allem die replikative Stressantwort untersucht. Dies bedeutet, dass die Schadensantwort der DNA und die Aktivierung zelleigener Reparaturmechanismen als Reaktion auf replikativen Stress durch Chemotherapeutika erforscht werden. Ist der akkumulierte DNA Schaden zu groß, sodass keine Reparatur mehr möglich ist, erfolgt zumeist ein Übertritt der Zelle in den programmierten Zelltod (Apoptose).

Hierfür werden in-vitro Experimente an den Kolonkarzinomzellreihen HCT116 Wildtyp, p53 knockout und p21 knockout durchgeführt. Zur Untersuchung der DNA Schadensantwort auf replikativen Stress werde ich via Western Blot Proteinaktivitäten verschiedener Signalkaskaden messen und zwischen den Zelllinien, sowie den unterschiedlichen Behandlungen, vergleichen. Ferner werden mit Hilfe von durchflusszytometrischen Analysen Zellzyklusprofile der behandelten Zellen erstellt und Zelltodmessungen durchgeführt. Als Messungszeitpunkte für die

jeweiligen Experimente habe ich, basierend auf meinen Vorexperimenten zum Proliferationsverhalten der HCT116 Zellen, einen Zeitrahmen von jeweils 24 h und 48 h gewählt. Zuletzt werde ich die Effekte einer kombinierten Therapie mit Entinostat in HCT116 PR130 knockout Zellen untersuchen. Der Ausgangspunkt hierbei sind die Ergebnisse der Publikation von A. Göder et al. (2018), welche zeigen konnten, dass eine fehlende Expression der regulatorischen Subeinheit der Serin/Threonin-Protein-Phosphatase 2A (PPP2R3A/PR130) eine Sensibilisierung der Zellen auf HDAC-Inhibitoren aufweisen.

Ziel dieser Experimente ist die genauere Erforschung des Einflusses von p53, p21 und PR130 auf die DNA Reparatur- und Schadensantwort in Kolonkarzinomzellen. Weiteres sollen die Wirkmechanismen und Auswirkungen der Kombinationstherapien in den jeweiligen Zellreihen untersucht werden, um ein möglichst zielgerichtetes Therapiekonzept zu entwickeln. Sollte sich hierbei eine erhöhte Akkumulation an DNA Schaden und Induktion von Apoptose zeigen, ließe sich über die zusätzliche Einführung von PR130, p53 und p21 als Marker im molekularen Screening zur gezielten Therapie des kolorektalen Karzinoms diskutieren.

## 2. Literaturdiskussion

---

### 2.1 Pathogenese und Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

Mit einer Inzidenz von ungefähr 600.000 Neuerkrankungen pro Jahr ist das kolorektale Karzinom der zweit häufigste maligne Tumor der Frau und das dritt häufigste Karzinom des Mannes in Deutschland (Hofheinz and Arnold, 2018).

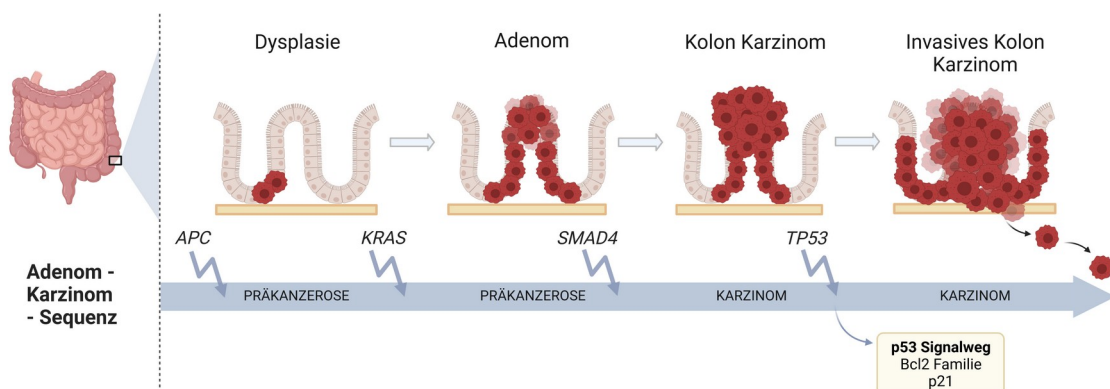
Die Tumorgenese lässt sich aktuell in drei Kategorien, entsprechend ihrer Prädispositionen und Risikofaktoren, zusammenfassen: die vererbte, die „familiäre“ und die sporadische Tumorgenese.

Weniger als 10% der kolorektalen Karzinome entstehen auf Grund einer tatsächlich genetisch vererbten Prädisposition, welche das Lebzeitrisiko an kolorektalem Karzinom zu erkranken deutlich erhöht. In diesen Fällen wurden spezifische Mutationen für die Entstehung des Krankheitsbildes identifiziert, wie beispielsweise die Keimbahnmutation des *Adenomatösen polyposis coli (APC)-Gens* im Rahmen der Familiären adenomatösen Polyposis (FAP).

Die bisher am wenigsten verstandene und erforschte Kategorie bildet die der „familiären“ kolorektalen Karzinome. Sie macht etwa 25% der kolorektalen Karzinome aus. Typisch sind vermehrtes familiäres Auftreten, jedoch ohne die kennzeichnenden Charakteristika der vererbten Syndrome wie FAP, wie spezifische Keimbahnmutationen. Ferner besteht für Familienmitglieder 1. Grades eines betroffenen Patienten ein um 1.7-fach erhöhtes Risiko gegenüber der Allgemeinbevölkerung an kolorektalem Karzinom zu erkranken. Die größte Gruppe der kolorektalen Karzinome bilden die sporadischen Neumutationen. Sie betreffen vor allem Patienten über 50 Jahren und entstehen auf Grund eines Zusammenspiels aus verschiedenen Risikofaktoren und der Akkumulation mehrerer Mutationen in den Zellen. (Harold Frucht, Aimee L Lucas 2020)

Unabhängig von der primären Einteilung in sporadisch, „familiär“ und vererbt, folgt der überwiegende Anteil (95%) der kolorektalen Karzinome einem ähnlichen Verlauf,

indem sich das Karzinom über mehrere Schritte aus tubulären oder villösen Adenomen und hyperplastischen Polypen entwickelt (siehe Abb. 1). Diese Adenome und Polypen sind benigne Neoplasien des Epithels der Kolonmukosa. Jedoch können auch Zellen der glatten Muskulatur oder des Bindegewebes innerhalb des Darmtraktes entarten und zur Karzinomsentstehung führen. Durch Faktoren wie Genmutationen, epigenetische Modifizierungen oder lokale Entzündungsreaktionen wird die Progression der Zellen zur malignen Entartung vorangetrieben. Das Modell der langsam voranschreitenden Adenom-Karzinom-Sequenz wie zuerst von Fearon und Vogelstein (1990) beschrieben, basiert auf der schrittweise stattfindenden Zelltransformation aus gesunden Epithelzellen über histologisch gutartig entartete Zellen in invasive Karzinomszellen (siehe Abb.1). Hierfür wird eine Akkumulation genetischer und epigenetischer Mutationen verantwortlich gemacht. Insbesondere das *TP53* Gen, welches für den Tumorsuppressor p53 kodiert, und Gene, die die Expression der Proteine des Phosphatidylinosytol-3-Kinase (PI3K) Signalwegs kodieren, sind häufig von Mutationen betroffen (Cappell 2008).



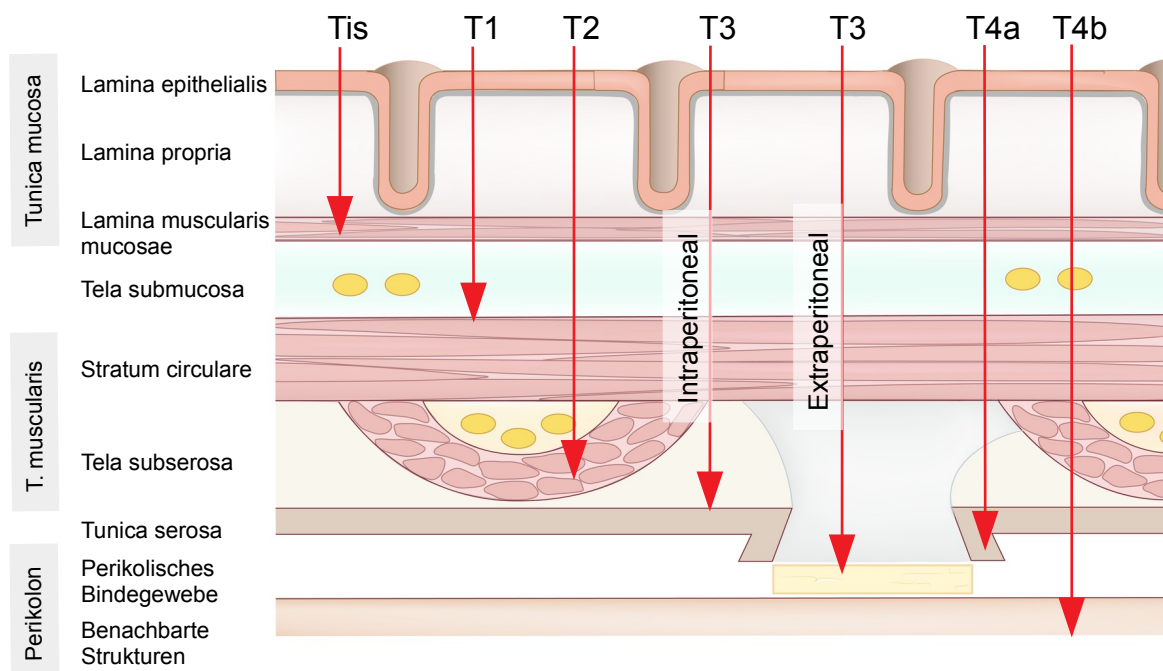
### Abb. 1: Tumorprogression gemäß der Adenom-Karzinom-Sequenz

Abbildung 1 zeigt die Adenom-Karzinom-Sequenz des kolorektalen Karzinoms. Das *APC-Gen* wird in gesunden Epithelzellen häufig von einer loss-of-function Mutation betroffen. Es kodiert das Tumorsuppressorprotein APC und führt bei einem Funktionsverlust zu einer Störung der epithelialen Architektur (Lesko et al. 2015). Im nächsten Schritt akkumulieren weitere Mutationen, wie beispielsweise im *KRAS-Gen*, welches über den RAS/MAPK-Signalweg maßgeblich zur Zellproliferation und Differenzierung beiträgt. Im Zuge der malignen Transformation erfolgt meist ein weiterer Mutationsschritt im *SMAD4 Gen*, welches über den Transkriptionsfaktor SMAD Einfluss auf die TGF-beta Signalkaskade hat. TGF-beta bindet an den TGF-Rezeptor und diffundiert in den Nukleus. Dies ermöglicht die Induktion verschiedener *downstream targets* und moduliert unter anderem die Synthese von p21 (Zhao, Mishra, and Deng 2018). Im letzten Schritt erfolgt meist eine Mutation von *TP53* (Fearon and Vogelstein 1990). Modifiziert nach Fearon und Vogelstein. Grafik erstellt durch BioRender.com.

Die 1933 gegründete internationale Organisation *Union Internationale Contre le Cancer (UICC)* mit Sitz in Genf führte zur besseren Charakterisierung und Systematisierung von Tumorerkrankungen ein einheitlich standardisiertes Klassifikationssystem (TNM) ein. Diese TNM Klassifikation wird auch für die histologische Einteilung des Kolorektalen Karzinoms verwendet (siehe Tab. 1). TNM ist ein Akronym und steht für die Kategorien „Tumor“, „Nodus“ und „Metastase“. Es beschreibt demnach die anatomische Tumorgröße (Tumor, siehe Abb.2), sowie Ausdehnung und Infiltrationsgrad in Lymphknoten (Nodus) oder anderes Gewebe (Metastase). Eine kondensierte Form der TNM Klassifikation, die UICC Stadieneinteilung (siehe Tab. 1), findet vor allem im klinischen Alltag Verwendung. Sie ermöglicht eine grobe Einschätzung der Prognose und dient als Anhaltspunkt für die Therapieentscheidung (Finlay A Macrae and Johanna Bendell 2021; Compton and Greene 2004)

*Tab. 1: Vereinfachte Darstellung der UICC Stadieneinteilung des Kolorektalen Karzinoms modifiziert nach Wittekind (2013)*

<b>UICC Stadium</b>	<b>TNM Klassifikation</b>	<b>Charakteristika</b>
<b>Stadium 0</b>	Tis	Carcinoma in situ
<b>Stadium I</b>	Tis-T2, N0, M0	Infiltrationstiefe bis max. zur Tunica muscularis, keine Lymphknoten (LK) Infiltration, keine Metastasen
<b>Stadium II</b>	Tis-T4, N0, M0	Infiltrationstiefe bis max. zum viszeralem Peritoneum/benachbarten Strukturen, keine LK Infiltrationen, keine Metastasen
<b>Stadium III</b>	Tis-T4, N1/2, M0	Infiltrationstiefe bis max. zum viszeralem Peritoneum/benachbarten Strukturen, 0 – ≥7 LK Infiltrationen, keine Metastasen
<b>Stadium IV</b>	Tis-T4, N1/2, M1	Sämtliche Infiltrationstiefen bis max. zum viszeralem Peritoneum/andere Organe, 0 – ≥7 LK Infiltrationen, Fernmetastasen



**Abb. 2: Darstellung der Tumorinfiltration innerhalb der Kolonwand gemäß der TNM Klassifikation**

Schematische Darstellung der Kategorie "T" der TNM Klassifikation zur Ergänzung von Tabelle 1. Tis entspricht dem Carcinoma in situ und bezeichnet einen lokalen, auf die Tunica mucosa beschränkten Tumor. Karzinome im T1 Stadium reichen bis in die Tela submucosa, infiltrieren aber im Vergleich zu T2 Tumoren nicht die Tunica muscularis. T3 Karzinome können sich intraperitoneal (Infiltration der Tela subserosa) und extraperitoneal (Ausbreitung in das perikolische Fettgewebe = sekundär retroperitoneale Anteile) manifestieren. Das T4 Stadium wird in T4a und T4b unterteilt. T4a Tumore infiltrieren das viszerale Peritoneum, während T4b Tumore bereits andere Organe und Strukturen befallen (Compton and Greene 2004). Abbildung modifiziert nach AMBOSS GmbH.

## 2.2 Therapie des kolorektalen Karzinoms

Die Therapie des kolorektalen Karzinoms in UICC Stadium 0 und I erfolgt mittels chirurgischer Resektion oder Hemikolektomie. Erste chemotherapeutische Ansätze wurden in den 1950er Jahren entwickelt. Mittels von der Veteran American Surgical Oncology Group (VASOG) und der Central Oncology Group (COG) durchgeführten klinischen Studien konnte eine bessere Überlebensrate bei Patienten mit einer kombinierten chirurgischen und medikamentösen Therapie mit 5-Fluorouracil gezeigt werden. Durch weitere Studien und Forschungen wurden systemische Chemotherapien weiter etabliert und sind heutzutage gemäß der aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und

Stoffwechselkrankheiten (DGVS) (2019) ab UICC Stadium III eine maßgebliche Komponente der kolorektalen Karzinomtherapie. Als Erstlinientherapie kommt hierbei eine adjuvante (der chirurgischen Resektion folgende) Monotherapie mit Fluoropyrimidinen in Frage. Für die adjuvante Chemotherapie in Stadium II sind zur Zeit keine eindeutigen Richtlinien vorhanden und unterliegt der individuellen Entscheidung des behandelnden Kollegiums. Hierbei werden Aspekte wie Alter, Allgemeinzustand und molekulargenetische Faktoren berücksichtigt. Als weitaus effektiver haben sich Kombinationstherapien erwiesen. Aus diesem Grund wurden feste Therapieschemata etabliert (siehe Tab. 2) und werden entsprechend der UICC Stadieneinteilung und dem Mutationsstatus der Karzinomzellen eingesetzt (Fakih 2015). Die Indikation für Kombinationstherapien besteht ab dem UICC Stadium III (Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) 2019).

*Tab. 2: Kombinationstherapieschemata der Erstlinientherapie in kolorektalen Karzinomen*

<b>FOLFOX</b>	Folsäure 5-Fluoruracil Oxaliplatin
<b>FOLFIRI</b>	Folsäure 5-Fluoruracil Irinotecan
<b>FOLFOXIRI</b>	Folsäure 5-Fluoruracil Oxaliplatin Irinotecan
<b>XELOX</b>	Capecitabin Oxaliplatin

Das Zytostatikum 5-Fluoruracil gehört zur Gruppe der Fluoropyrimidine und ist ein Antimetabolit. Auf Grund seiner Strukturähnlichkeit zu den DNA Nukleotiden Thymin und Cytosin sowie zu dem RNA Nukleotid Uracil, kann 5-Fluoruracil an deren Stelle in die DNA oder RNA eingebaut werden. Hierfür wird 5-Fluoruracil von dem Enzym UMP-Pyrophosphorylase zuerst in 5-Fluor-UMP umgewandelt und weiter zu 5-Fluor-UTP phosphoryliert. Im nächsten Schritt konkurriert es in der RNA Synthese mit Uridintriphosphat (UTP). Wird statt dem UTP 5-Fluor-UTP eingebaut, so entsteht



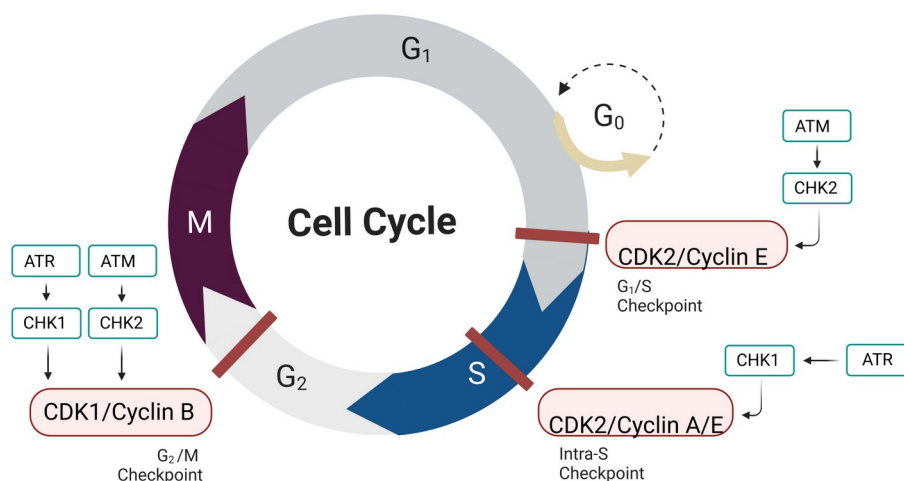
fehlerhafte RNA, wodurch die Protein Biosynthese gehemmt wird. Des Weiteren hemmt 5-Fluor-dUMP ebenfalls das Enzym Thymidylat-Synthase (TS). Vereinfacht dargestellt, katalysiert TS die Umwandlung von Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) in Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) durch eine Methylgruppenübertragung von dem Substrat 5,10-Methyl-Tetrahydrofolat auf das alpha-Kohlenstoffatom von dUMP. Es entsteht dTMP und Dihydrofolat. Während diesem Reaktionsvorgang bilden die Argininseitenketten der TS eine reversible Wasserstoffbrückenbildung mit der Phosphatgruppe des dUMPs aus. Reagiert die TS stattdessen mit einem 5-Fluor-UUMP, so wird eine kovalente Fluor-Kohlenstoff-Bindung gebildet. Es bildet sich ein TS – 5-Fluor-UUMP - CH<sub>2</sub>-Tetrahydrofolsäure Komplex, bei welchem die Bindungsstelle der TS blockiert ist. Dem Enzym ist es somit nicht möglich weitere Reaktionen zu katalysieren und ist effektiv gehemmt. Nachdem TS das einzige Enzym der zelleigenen dTMP Produktion ist, kommt es zur Depletion des dTTP Pools und im weiteren Verlauf zum Abbruch der DNA-Replikation und Reparatur (Longley, Harkin, and Johnston 2003; Papamichael 1999). Durch die Hemmung der TS und der Depletion des dTTP Pools entsteht ein Überschuss an Desoxyuridintriphosphat (dUTP). Auf Grund der Nukleotidinbalance und dem relativen Überangebot an dUTP kommt es zu einem fehlerhaften Einbau des dUTPs in die DNA. Die Integration des 5-Fluorouracil Metaboliten FdUTP in die DNA ist ebenfalls möglich. Hierdurch erfolgt ebenfalls ein Abbruch der DNA-Replikation (Peters et al. 2000).

Ein weiteres Chemotherapeutikum ist das Camptothecin-Derivat Irinotecan (CPT-11). Irinotecan ist ein Prodrug und wird in der Leber zu seinem deutlich wirksameren Metaboliten SN38 carboxyliert. Beide Formen inhibieren das Enzym Topoisomerase I, welche während der DNA-Replikation benötigt wird (Bailly 2019). Durch das Eröffnen der Replikationsgabel im Zuge der DNA-Replikation entsteht auf Grund von Torsionskräften eine Supraspiralisierung des DNA Einzelstrangs. Die Topoisomerase I löst diese Supraspiralisierung indem sie einen Einzelstrangbruch in der DNA herbeiführt, welcher im Anschluss wieder ligiert wird (Heinrich et al. 2014). Irinotecan bildet mit Topoisomerase I einen Komplex an der DNA, wodurch zytotoxische, protein-gekoppelte Einzelstrangbrüche entstehen, die zum Zelluntergang führen (Bailly 2019).

Hydroxyurea ist ein Ribonukleotidreduktase Inhibitor und gehört zur Gruppe der Zytostatika. Durch die Hemmung des Enzyms Ribonukleotidreduktase wird die Reduktion der Ribose zu Desoxyribose unterbunden. Somit wird die De-novo Synthese der DNA maßgeblich gestört und die Zellen gehen in einen G1/S-Phase Arrest über (Timson 1975; Madaan, Kaushik, and Verma 2012). Hydroxyurea ist aktuell unter Anderem zur Therapie von Melanomen, Ovarialkarzinomen und Leukämien zugelassen, es ist jedoch aktuell noch kein Bestandteil der Standardtherapie für kolorektale Karzinome (FDA 2016).

## 2.3 Zellzyklus und Checkpoint Regulation

Der Zellzyklus, welche eine Zelle durchläuft um sich zu teilen, besteht aus vier verschiedenen Phasen. Während der Synthese Phase (S-Phase) wird die DNA verdoppelt und in der Mitose Phase (M-Phase) teilt sich die Zelle in zwei identische Tochterzellen. Diese beiden Phasen werden durch die Gap Phasen (G1- und G2-Phase) getrennt. Bei diesen Phasen handelt es sich nicht um Phasen der Inaktivität, sondern um Phasen, welche der Zellvergrößerung und Zellorganisation dienen. Ein korrekter Ablauf dieser beiden Phasen spielt eine kritische Rolle in der Kontrolle von Nährstoff Verteilungen in der Zelle und der Funktionalität von Zellorganellen (Barnum and O'Connell 2014).



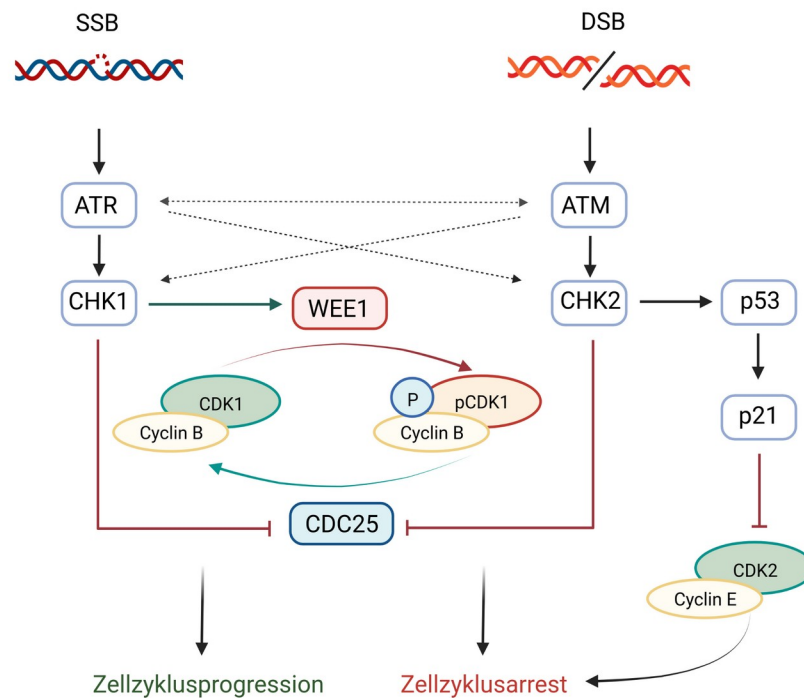
**Abb. 3: Checkpoint und Zellzyklusregulation**

Schematische Darstellung der vier Phasen des Zellzyklus. Der Übergang der G1-Phase in die S-Phase wird über den G1/S Checkpoint reguliert. Dieser wird aus dem CDK2/Cyclin E Proteinkomplex gebildet und über die ATM/CHK2 Signalkaskade aktiviert (Bartek and Lukas 2001). Die Proteine CDK2/Cyclin A/E bilden den Intra-S Checkpoint und wird über die ATR/CHK1

Signalkaskade reguliert (Löbrich and Jeggo 2007). Der Übergang von der G2-Phase und die M-Phase wird sowohl über die ATR/CHK1 als auch ATM/CHK2 Kaskade gesteuert. Den G2/M Checkpoint bilden der CDK1/Cyclin B Komplex (Satyanarayana and Kaldis 2009). Grafik erstellt mittels biorender.com.

Der zentrale Mechanismus, über den der Zellzyklus reguliert wird sind die cyclin-abhängigen Kinasen (CDK). CDKs sind Serin-Threonin Proteinkinasen, welche die Schlüsselsubstrate der DNA phosphorylieren. Der Übergang der CDKs in ihre aktive Form erfolgt durch die Bindung von Cyclinen an deren katalytische Untereinheit. Cycline werden streng über ihre Synthese und ubiquitin-gesteuerte Proteolyse reguliert. Zusätzlich können Cycline ebenfalls über Cyclin-Kinase-Inhibitoren (CKI), wie dem Protein p21, moduliert werden, indem sie die Übertragung von Phosphatgruppen auf ihre Substrate inhibieren.

Die korrekte Zellzyklusprogression wird anhand mehrerer Kontrollmechanismen in den einzelnen Phasen, sogenannten „Checkpoints“, überprüft. Die drei wichtigen Checkpoints sind der G1/S-Phase Checkpoint, der Intra-S-Phase Checkpoint und der G2/M-Phase Checkpoint (siehe Abb. 3). Entsteht in der G1 Phase ein Doppelstrangbruch der DNA, wird das Protein Ataxia teleangiectasia mutated (ATM) aktiviert. Es führt über einen Signaltransduktionsweg zur Phosphorylierung und somit Aktivierung von CHK2. CHK2 kann durch posttranslationale Modifikationen zu einer schnellen Aktivierung des CDK2/Cyclin E gesteuerten G1/S-Phase Checkpoints führen. Das Expressieren des Tumorsuppressors p53, welches ebenfalls über ATM initiiert wird, dient als Transkriptionsfaktor für den CKI p21, wodurch CDK2 gehemmt wird. Dieser Mechanismus führt ebenfalls zu einem G1-Phase Arrest. Er tritt jedoch verzögert in Kraft und dient vermutlich vorrangig dem Erhalt des G1/S-Phase Checkpoints (Bartek and Lukas 2001). Durch den Zusammenbruch der Replikationsgabel wird Ataxia teleangiectasia RAD51 (ATR) durch einen Einzelstrangbruch der DNA aktiviert. Über das Protein CHK1 wird eine CDK2/Cyclin A/E abhängige Arretierung des Zellzyklus in der S-Phase bewirkt (siehe Abb. 4). Dieser Mechanismus bildet den Intra-S-Phase Checkpoint (Löbrich and Jeggo 2007).



**Abb. 4: Regulierung des G2/M-Checkpoints und die zentrale Rolle des Proteins WEE1. Regulierung des S-Phase Checkpoints**

Über DNA-Einzel- oder Doppelstrangbrüche erfolgt die Rekrutierung und Aktivierung vom ATR/CHK1 und ATM/CHK2 Signalweg. CHK1 induziert die Proteinkinase WEE1, welche den CDK1/Cyclin B Komplex phosphoryliert und somit inaktiviert. Hierdurch kommt es zu einer Zellzyklusarretierung in der G2-Phase. Die Phosphatase CDC25 dephosphoryliert den pCDK1/Cyclin B Komplex, woraufhin diese die Progression des Zellzyklus vorantreibt. CDC25 wird bei Vorliegen eines DNA Schadens von den Proteinen CHK1 und CHK2 inhibiert. Im Falle eines Doppelstrangbruchs der DNA wird über ATM/CHK2 der Tumorsuppressor p53 stabilisiert, woraufhin p21 aktiviert wird. p21 inhibiert den CDK2/Cyclin E Komplex und induziert somit einen S-Phase Arrest.

Die Abbildung 4 zeigt den Mechanismus des G2/M-Phase Checkpoints. Der G2/M-Phase Checkpoint wird über ATM und ATR vermittelt, welche über die Proteinkinasen CHK1 und CHK2 Einfluss auf bedeutende Prozesse des Zellzyklus ausüben. Der Eintritt in die M-Phase wird über CDK1/Cyclin-Komplexe vermittelt (Satyanarayana and Kaldis 2009). CDK1 wiederum wird über ein Zusammenspiel zwischen der Phosphatase CDC25 und den WEE Kinasen reguliert. Zu den WEE Kinasen gehören Membran-assoziiertes PKMYT1, WEE1B und WEE1, welches vor allem in somatischen Zellen die bedeutendere Rolle spielt (Schmidt et al. 2017; Nakanishi et al. 2000). WEE1 ist zuständig für die inhibitorische Phosphorylierung von CDK1 an der Position Tyr15. Dadurch wird ein Übertritt in die Mitose aus der G2-Phase verhindert. Erst durch die Dephosphorylierung von pCDK1 mittels CDC25 kann CDK1 seine Funktion wieder aufnehmen und Phosphatgruppen von ATP auf seine

Substrate übertragen. So kann CDK1 selbst auch über feedback-loops seinen Inhibitor WEE1 phosphorylieren und somit inaktivieren (Watanabe et al. 2004). Gleichzeitig ist es CDK1 möglich die Phosphatase CDC25 zu aktivieren und somit über Autoamplifikation seine eigene Aktivität zu steigern. Der Übertritt in die M-Phase wird wieder aufgenommen (Schmidt et al. 2017). Im Rahmen eines DNA-Schadens wird über den G2/M-Checkpoint CDC25 von CHK1 inhibiert. Das Gleichgewicht von CDK1 zu pCDK1 verschiebt sich auf Seiten des inaktiven pCDK1, da es nicht mehr ausreichend von CDC25 dephosphoryliert werden kann. Dies führt möglicherweise zu einem verspäteten Übertritt in die Mitose und die Zelle verharrt in einem G2-Arrest (Zeng et al. 1998; Jin, Gu, and Morgan 1996). In Tumorzellen ist eine Überexpression von WEE1 häufig zu beobachten (Leary, Auguste, and Mesnage 2016; Magnussen et al. 2012; H.-Y. Kim et al. 2016) wodurch diese sich als möglicher Ansatzpunkt einer antitumoralen Therapie anbietet. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von WEE1 ein Versagen des G2/M-Checkpoints auslöst und Zellen in eine mitotische Katastrophe treibt, sowie diese für weitere Chemotherapeutika sensibilisiert (Matheson, Backos, and Reigan 2016; Yin et al. 2018).

Während p53 für den Ablauf des G1/S-Phase Checkpoints eine maßgebliche Rolle spielt, ist seine Funktion im G2/M-Phase Checkpoint vernachlässigbar (Löbrich and Jeggo 2007). Schlussfolgernd ließe dies vermuten, dass in Zellen mit *TP53* loss-of-function Mutationen die Tumorgenese und Progression der kanzerösen Zellen weitgehend von der Funktionalität des G2/M-Phase Checkpoints abhängig ist. Diese Hypothese wird im Laufe dieser Arbeit weiter untersucht.

Wird ein DNA Schaden an einem der Checkpoints erkannt, kommt es zu einem Stillstand des Zellzyklus. Die Zelle kann daraufhin Reparaturmechanismen einleiten oder in den programmierten Zelltod übergehen (Roos, Thomas, and Kaina 2016).

## **2.4 Die DNA Schadensantwort**

Die fehlerfreie DNA Replikation ist ein essentieller Prozess um die genetische Information korrekt an die Tochterzellen weiterzugeben und den fehlerlosen Ablauf der Zellfunktionen zu gewährleisten (Mazouzi, Velimezi, and Loizou 2014).

Verschiedene endogene sowie exogene Faktoren können diesen Prozess jedoch stören und Schäden in der DNA hervorrufen. Darunter fallen unter anderem die Depletion des dNTP Pools durch Chemotherapeutika, eine durch die Aktivität von Onkogenen gesteigerte Initiierung der DNA Replikationsursprünge (ORI), sowie sterische Hindernisse wie DNA crosslinks, DNA Doppelstrangbrüche und RNA-DNA Hybridprodukte. In solchen Fällen wird die Maschinerie der DNA Schadensantwort, kurz DDR (*DNA damage response*), aktiviert. Die DDR bezeichnet ein komplexes Zusammenspiel aus verschiedenen Signalwegen, die die DNA Reparaturmechanismen, Checkpointmechanismen und Apoptose vermitteln (Fokas et al. 2014). Frühe DDR Sensoren bilden die PIKKs (*PI3K-related kinases*) ATM und ATR (Ubhi and Brown 2019). Eine Entkopplung der DNA Polymerase von der DNA Helikase auf Grund von DNA-Schäden, kann zu einer Akkumulation von DNA Einzelsträngen (ssDNA) führen. Hierdurch ist eine Verlangsamung, Stillstand oder vollständiger Zusammenbruch der Replikationsgabel möglich, wodurch die DNA Synthese zum Erliegen kommt. Dies wird gemeinhin als replikativer Stress bezeichnet. Die Entstehung von chromosomaler Instabilität, welche eine maligne Entartung der Zellen vorantreibt, wird durch replikativen Stress gefördert (Zeman and Cimprich 2014; Ubhi and Brown 2019). HU-induzierter DNA Schaden und replikativer Stress sind unter anderem Auslöser der ATR Signalkaskade. Das Replikationsprotein A (RPA) bindet an die akkumulierende ssDNA und stabilisiert die Replikationsgabel. Zusätzlich aktiviert RPA das Protein ATRIP, welches an ATR bindet und dieses rekrutiert. Über weitere Rekrutierungsschritte wird ATR phosphoryliert und somit aktiviert (Mordes and Cortez 2008; Derheimer et al. 2007). ATR wiederum phosphoryliert sein unmittelbares Zielprotein CHK1 (Fokas et al. 2014), wodurch ein Zellzyklus Arrest in G2 induziert wird (siehe 2.3 ). Eine Phosphorylierung von ATR an Ser33 oder von seinem Zielprotein CHK1 an Ser345 ist demnach ein möglicher Hinweis auf replikativen Stress. Des weiteren phosphoryliert ATR auch die Histonvariante H2AX (Chanoux et al. 2009) und p53 an Ser15, wodurch p53 stabilisiert wird. Der Mechanismus dahinter liegt in der Hemmung seiner Interaktion mit der Ubiquitinligase MDM2, ein Enzym welches den ubiquitin-vermittelten Abbau von p53 induziert (Lakin, Hann, and Jackson 1999). p53 spielt eine zentrale Rolle bezüglich der Entscheidung der Zelle zwischen DNA-Reparatur und Apoptose (siehe 2.7 ). Die Phosphorylierung von p53 kann ebenfalls über ATM induziert werden. ATM wird über den MRN-Komplex an DNA Abschnitte mit DNA-Doppelstrangbrüchen

(DSB) rekrutiert und vermutlich über Autophosphorylierung (Bakkenist and Kastan 2003) aktiviert (Blackford and Jackson 2017). ATM kann die Effektor kinase CHK2 direkt phosphorylieren, woraufhin p53 ebenfalls an Ser15 phosphoryliert und stabilisiert wird. Dies führt über p21-vermittelte Mechanismen zur Arretierung des Zellzyklus in G1 (Loughery et al. 2014a). Zusätzliche Zielproteine von ATM bilden NBS1 und BRCA1. Über Komplexbildungen und Induktion der nachfolgenden Signalkaskade ist eine Aktivierung des Intra-S-Phase Checkpoints ebenfalls möglich (Kastan and Lim 2000). Ein weiteres Zielprotein von ATM ist H2AX. Eine Phosphorylierung von H2AX ( $\gamma$ H2AX) ist Teil der frühen Schadensantwort auf DSBs und unterstützt die Rekrutierung weiterer Proteine an den Ort des DNA-Schadens (Rogakou et al. 1999). ATM vermittelt vor allem über homologe Rekombination die Reparatur von DNA-Schäden (Riballo et al. 2004; Morrison et al. 2000). DSBs stören die Struktur von Nukleosomen maßgeblich und fördern chromosomale Instabilitäten und Chromosomenaberrationen (Shrivastav et al. 2009). Sie stellen äußerst zytotoxische Ereignisse innerhalb der Zelle dar und treiben die Entartung der Zelle voran. Aus diesem Grund ist eine rasche Aktivierung der DNA Reparaturmechanismen unentbehrlich. Befindet sich die Zelle im Checkpoint-vermittelten Zellzyklusarrest, können DSBs vor allem über nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) und homologe Rekombination (HR) repariert werden. HR wird über den MRN-Komplex initiiert und ist auf die S- und G2-Phase des Zellzyklus beschränkt, da HR das Schwesterchromatid als Vorlage für die Wiederherstellung des geschädigten Chromatids benötigt. Im Zuge dessen ist ein Verlust der Heterozygotie zwischen mütterlichen und väterlichen Chromosomen möglich. Im Gegensatz dazu ist eine Reparatur von DSB mittels NHEJ während dem gesamten Zellzyklus möglich (Brandsma and van Gent 2012), tritt jedoch bevorzugt in der G1-Phase auf (Shrivastav et al. 2009). Hierbei werden DNA-abhängige Proteinkinasen (DNA-PK), in manchen Fällen auch ATM, an die Bruchenden der DNA rekrutiert um den Reparaturprozess zu starten. Sollten die DNA Enden inkompatibel sein, können diese über Nukleasen wie Artemis zurechtgeschnitten oder über DNA Polymerasen aufgefüllt werden. Im Anschluss ligiert der DNA-Ligase-Komplex die beiden Enden des DSB (Lieber 2010). Nach erfolgreicher DNA Reparatur tritt die Zelle wieder in den Zellzyklus ein. Ist der Schaden der Zelle jedoch zu groß, wird die Apoptose induziert (siehe 2.7 ).

## **2.5 Inhibierung von Histondeacetylasen mit MS-275 als therapeutischer Ansatz in kolorektalen Karzinomen**

Histondeacetylasen (HDACs) bilden eine Gruppe an Enzymen, welche über epigenetische Regulation Einfluss auf die Chromatinstruktur und somit die Genexpression ausüben (Krämer, Göttlicher, and Heinzl 2001; Milazzo et al. 2020). HDACs dienen vorrangig der Modifikation von Histonen. Histone sind während inaktiven Phasen der DNA-Synthese durch vorhandene Aminogruppen an ihren Lysinresten positiv geladen. Dies erleichtert ihre Bindung an die negativ geladene DNA-Doppelhelix und ermöglicht ein kondensiertes Vorliegen des Chromatins. Eine Transkription ist in diesem Zustand nicht möglich. Durch Acetylierung der Aminogruppen in Amidgruppen über Histonacetylasen (HAT) wird die positive Ladung der Histone neutralisiert, wodurch die Bindung von Histonen an die DNA deutlich geschwächt wird. Es kommt zu einer Lockerung der Chromatinstruktur und die Transkription der Genabschnitte wird ermöglicht. Die Aufgabe von HDACs ist die Entfernung dieser Acetylgruppen. Dadurch wird der DNA-Histonkomplex in seine kondensierte Form zurückgeführt und weitere Transkriptionsvorgänge werden verhindert (Heinrich et al. 2014).

Neben der Funktion als epigenetischer Regulator, interagieren HDACs auch mit zahlreichen zytoplasmatischen Proteinen und Cofaktoren, sodass sie Einfluss auf Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose (Singh, Shankar, and Srivastava 2005), Proteinhomöostase (Chuang et al. 2009) und eine unterstützende Wirkung auf die Hypoxie-induzierte Angiogenese (M. S. Kim et al. 2001) haben. HDACs können in vier Gruppen, Klasse I - IV, kategorisiert werden. Die Klassen I, II und IV werden häufig als „klassische“ HDACs (HDAC1-11) bezeichnet und agieren an ihrer katalytischen Untereinheit über Zink-abhängige Mechanismen (Witt et al. 2009). Zur Klasse III zählen im Gegensatz dazu die NAD<sup>+</sup>-abhängigen Sirtuine (SIRT1-7) (Van Dyke 2014). In soliden Tumoren wurde häufig eine Überexpression an Klasse I HDACs, sowohl auf der Protein Ebene als auch auf der mRNA Ebene, gefunden (Wilko Weichert 2009). Insbesondere HDAC1-3 zeigten in undifferenzierten, metastasierten kolorektalen Karzinomzellen eine gesteigerte Aktivität. In einer in-vivo Studie der Charité Universitätsmedizin (W. Weichert et al. 2008) konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen HDAC1-3 Überexpression und erhöhter



Tumorzellproliferation, geringe Zelldifferenzierung und einer signifikant erniedrigten Patientenüberlebensrate existiert. Dies dient als Ansatzpunkt, dass die Integration eines HDAC Inhibitors (HDACi) in das Therapieschema möglicherweise bei Patienten mit einer solchen HDAC Überexprimierung einen besonderen Therapievorteil einbringen könnte. Aus diesem Grund wird im Rahmen der Dissertation die zelluläre Antwort von HCT116 Kolonkarzinomzellen auf Entinostat (MS-275) einzeln und in Kombination mit weiteren Chemotherapeutika untersucht. MS-275 ist ein synthetisches Benzamid-Derivat HDACi, welches Klasse I HDAC1-3 selektiv hemmt. Die Hemmung von HDAC1-3 führt zu einer Inhibierung der Zellproliferation und terminalen Differenzierung und führt subsequent zur Apoptose (Roisin M Connolly et al. 2017; Richon et al. 2000; Xu, Parmigiani, and Marks 2007). Der Mechanismus dahinter beruht auf der Induktion einer Histon Hyperacetylierung, wodurch die Transkription spezifischer Genabschnitte aktiviert wird. Ein hierbei häufig induziertes Zielgen ist *CDKN1A* auf Chromosom 6, welches den CKI p21 encodiert. Es handelt sich hierbei um eine p53-unabhängige Aktivierung von p21, die durch eine Histon-Hyperacetylierung im Bereich der *CDKN1A*-Promotoren induziert wird. In humanen multiplen Myeloma ARP-1 Zellen zeigte sich bereits eine Assoziation zwischen Histon H3 und H4 Hyperacetylierung und *CDKN1A*-Promotoraktivität (Gui et al. 2004). Infolge der universellen Hemmung von CDKs durch p21 (Xiong et al. 1993) gerät die Zelle in einen Zellzyklusarrest. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass Harnblasenkarzinomzellen, die mit dem HDACi SAHA inkubiert wurden, in Abhängigkeit von der Dosishöhe in verschiedenen Zellzyklusphasen arretierten. Eine geringe HDACi Konzentration resultierte überwiegend in einem G1-Phase Arrest, während Zellen, die mit hohen HDACi Dosen behandelt wurden, in G2/M-Phasen arretierten (Richon et al. 2000). Ziel dieser Dissertation ist der zusätzliche Nachweis dieser zellulären Prozesse in humanen Kolonkarzinomzellen. Im weiteren Schritt wird die Auswirkung von einem p21 knockdown auf die Wirkmechanismen von MS-275 untersucht.

## **2.6 Einfluss von PR130 auf die DNA-Schadensantwort**

Die Protein Phosphatase 2A (PP2A) ist eine Serin/Threonin Phosphatase, welche in

ihrer aktiven Form aus drei Untereinheiten gebildet wird, besteht aus einer strukturellen Untereinheit (PP2A-A), einer regulierenden Untereinheit (PP2A-B) und einer katalytischen Untereinheit (PP2A-C). Aktuelle Forschungen liefern immer mehr Hinweise, dass PP2A an einer Vielzahl intrazellulärer Prozesse, wie die DNA-Schadensantwort und Apoptose, beteiligt ist. Insbesondere die Untereinheit B kommt in vielen verschiedenen Isoformen vor, welche durch alternatives Splicing oder Translationen entstehen. Aufgrund dieser Vielfalt ist es der Untereinheit PP2A-B möglich, die Substratspezifität und Aktivität der Phosphorylierung von PP2A entscheidend zu regulieren (Dzulko et al. 2020; Schäfer 2015). In der Literatur konnte gezeigt werden, dass die regulatorische Untereinheit PR130, welche durch das Gen *PPP2R3A* kodiert wird, Auswirkungen auf die DNA-Schadensantwort hat. Replikativer Stress (RS) führt wie in Kapitel 2.4 beschrieben zu einer Aktivierung komplexer Signalkaskaden, welche entweder die DNA-Schadensreparatur oder den programmierten Zelltod einleiten. Entscheidende Schlüsselproteine in diesem Prozess sind ATR/CHK1 und ATM/CHK2. In der Arbeit von Göder (2019) konnten, nach Inkubation von kolorektalen Karzinomzellen (HCT116) mit Hydroxyurea und MS-275, Veränderungen der Aktivität von ATM als auch Auswirkungen auf den WEE1 und p53 Signalweg festgestellt werden. Diese wurden auf die Interaktion mit der PP2A Untereinheit PR130 zurückgeführt. Die genetische Eliminierung von PR130 in HCT116 Zellen durch die CRISPR/Cas-9 Technologie führte zu einer Anfälligkeit für Zellzyklus-Störungen und RS-induzierter Apoptose. In dieser Arbeit wird im nachfolgenden Schritt die Rolle von PR130 in der DNA-Schadensantwort und Zellzyklusprogression nach Inkubation mit weiteren Substanzen, die in der onkologischen Therapie in der Klinik von Bedeutung sind (Irinotecan, 5-Fluoruracil), einzeln und in Kombination mit MS-275 untersucht.

## **2.7 Apoptose**

Das Einleiten der Checkpoint Mechanismen durch entstandenen DNA-Schaden entscheidet über das Schicksal der Zelle. Sie kann entweder durch die erfolgreiche Implementierung der DNA Reparaturmechanismen wieder in den Zellzyklus eintreten und weiter proliferieren oder in den programmierten Zelltod, die Apoptose, übergehen (Daniel 2003). Die Apoptose ist ein streng regulierter Vorgang und bezeichnet den

systematischen Vorgang des Zellabbaus. Dabei wird der Zellinhalt in Apoptosekörperchen verpackt und mittels Phagozytose eliminiert. Im Vergleich zur Nekrose, welche durch das Anschwellen der Zellorganellen und dem Verlust der Zellmembranstabilität zum Untergang der Zelle führt (Rock and Kono 2008), gelangt beim apoptotischen Zellabbau kein freier Zellinhalt in das umliegende Gewebe. Hierdurch kann eine inflammatorische Immunreaktion des Gewebes weitestgehend vermieden werden (Elmore 2007; Kurosaka et al. 2003).

Die Entscheidung zwischen DNA-Schadensreparatur und Apoptose wird anhand miteinander verknüpfter Signalwege reguliert, welche im Rahmen der DDR aktiviert werden. Entscheidend sind hierbei Proteine mit einer dualen Funktion wie p53, die sowohl pro-apoptotisch als auch zum Überleben der Zelle beitragen. Welche der beiden Mechanismen p53 einleitet, hängt vom DNA-Schaden ab. Während niedrige DNA-Schadenswerte p53 nur vorübergehend aktivieren, führen hohe DNA-Schadenswerte zu einer permanenten Aktivierung und Stabilisierung von p53. Die vorhandene Menge an p53 ist entscheidend für die Transkription seiner Effektorproteine. Promotoren für Genabschnitte, welche den Eintritt von Zellzyklusarrest und Reparaturmechanismen kodieren, verfügen über eine hohe Affinität zu p53. Eine geringe p53 Aktivität ist demnach bereits ausreichend um diese zu starten. Im Vergleich hierzu verfügen Promotoren für Apoptose-assoziierte Genabschnitte über eine niedrige Affinität zu p53. Ein deutlich höheres Angebot an p53 ist daher nötig, um deren Transkription einzuleiten. Zusammengefasst lässt sich daher schlussfolgern, dass die Entscheidung über Zelltod oder Überleben unter anderem vom Schwellenwert für Schlüsselproteine wie p53 abhängig ist (Roos, Thomas, and Kaina 2016).

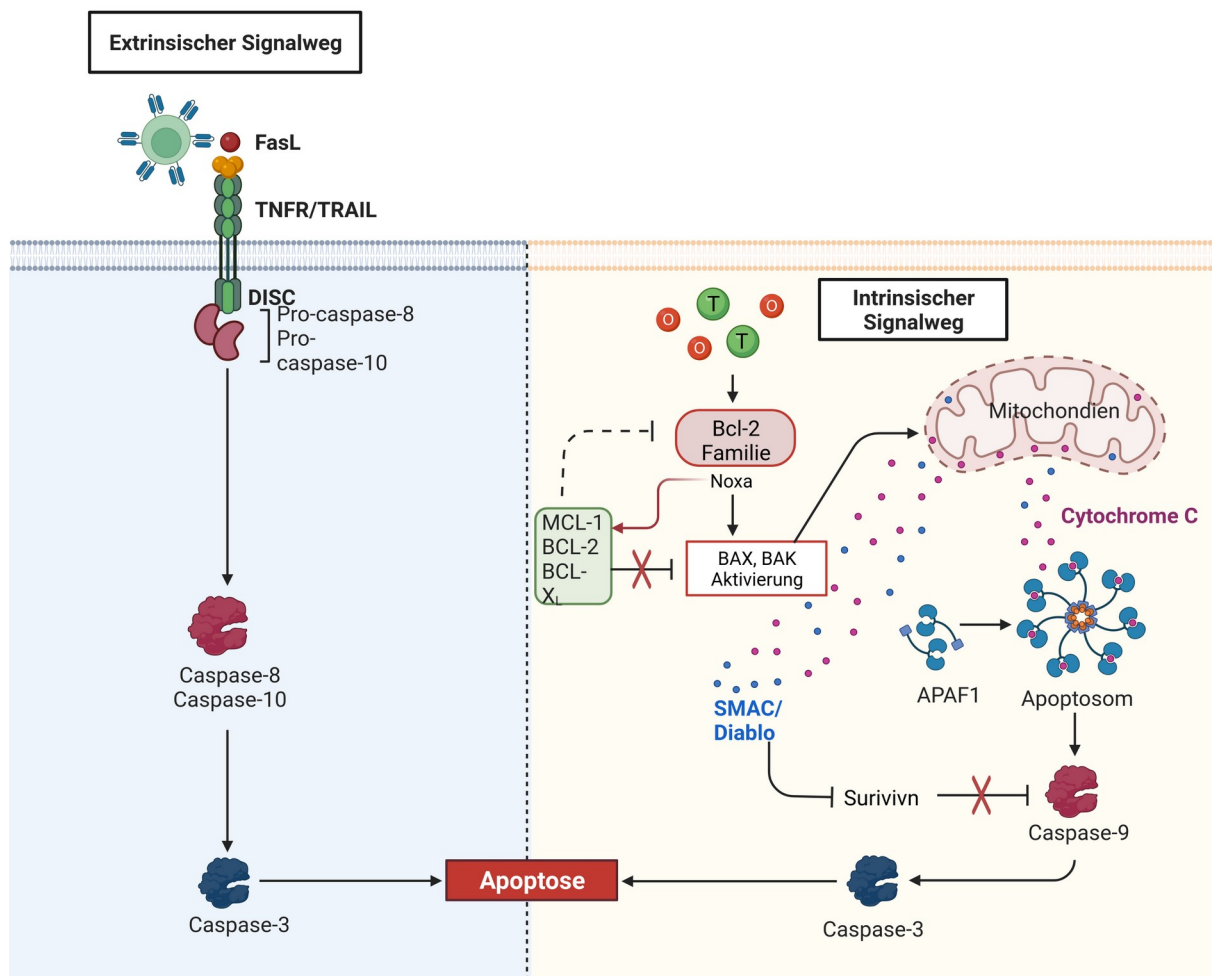
Der zentrale Apoptose Mechanismus beruht auf der Aktivität von Caspasen. Diese gehören zur Gruppe der Cystein Proteasen und können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Die Gruppe der „Initiatoren“ (Caspase-2, -8, -9, 10) und der „Effektoren“ (Caspase-3, -6, -7). Caspasen liegen im Zytosol der Zelle in ihrer inaktiven Form als Proenzym vor (Khosravi-Far and White 2008). Entstehen in einer menschlichen Zelle zytotoxische Ereignisse durch Stimuli wie Toxine oder oxidativen Stress, wird die Apoptose über den intrinsischen Signalweg eingeleitet. Dieser findet an den Mitochondrien statt und unterliegt der Regulation der Bcl-2 Familie. Unter physiologischen Bedingungen sorgt die anti-apoptotische Bcl-2 Familie für die

Stabilisierung der mitochondrialen Membranpermeabilität. Entsteht in der Zelle ein DNA-Schaden, wird in der p53-abhängigen Apoptose über p21 das Apoptose-assoziierte Zielgen *Noxa* exprimiert. Noxa ist ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie mit nur einer BH3 (*Bcl-2 homology 3*)-Domäne (Oda 2000). Über seine BH3-Domäne interagiert Noxa mit anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie wie Mcl-1, wodurch dessen Abbau induziert wird (Willis 2005). Mcl-1 und Bcl-x<sub>L</sub> inhibieren in gesunden Zellen über Komplexbildung die beiden pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak der Bcl-2 Familie (Haschka et al. 2015; Willis 2005). Steht die Zelle jedoch unter zytotoxischem Stress fällt die Inhibierung von Bak und Bax über den oben genannten Mechanismus weg, sodass diese durch Oligomerisation Poren innerhalb der mitochondrialen Membran bilden. Durch diese Poren gelangt Cytochrom c in das Zytosol und bildet mit Apaf-1 und ATP das Apoptosom (Acehan et al. 2002). Das Apoptosom rekrutiert und aktiviert daraufhin Procaspase-9. Die aktive Caspase-9 spaltet im folgenden Schritt Effektorcaspasen und wandelt diese in ihre aktive Form um, wodurch der Suizid der Zelle eingeleitet wird (siehe Abb. 5). Zusätzlich können weitere pro-apoptotische Proteine aus den Mitochondrien austreten wie beispielsweise Smac/Diablo (Adrain, Creagh, and Martin 2001). Smac/Diablo antagonisiert die Wirkung von Apoptose-inhibierenden Proteinen (IAPs) wie beispielsweise Survivin (Roos, Thomas, and Kaina 2016), wodurch weitere Caspasen rekrutiert werden können (siehe Abb. 5). Die Durchführung der Apoptose wird somit unterstützt (Duprez et al. 2009).

Neben dem intrinsischen Signalweg ist die Apoptose ebenfalls über den extrinsischen Signalweg induzierbar. Hierbei lösen Todesrezeptoren an der Zellmembran die Signalkaskade der Caspasen aus. Binden die entsprechenden Faktoren an Rezeptoren der TNFR (*tumornecrosis factor receptor*) Superfamilie CD95 oder an TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*)-Rezeptoren wird ein Zelltod-induzierender Signalkomplex (*death-inducing signaling complex, DISC*) gebildet. Dieser rekrutiert und aktiviert Procaspase-8 und Procaspase-10. Caspase-8 und Caspase-10 ermöglicht durch die direkte Spaltung von Procaspase-3 die Umwandlung in seine aktive Form und somit die Exekution der Apoptose (Fulda and Debatin 2006; Duprez et al. 2009) (siehe Abb. 5).

Ist die Apoptose induziert, erfolgt die bereits oben genannte Phase der Chromatinkondensation und Zellschrumpfung. Im Anschluss erfolgt eine Caspasen-

vermittelte Fragmentierung der DNA und Zellstrukturproteine. Diese werden schlussendlich in Apoptosekörperchen verpackt und von Makrophagen phagozytiert (Elmore 2007).



### Abb. 5: Extrinsische und Intrinsische Apoptose-Signalweg

Der extrinsische Signalweg wird mittels der Bindung eines, meist T-Zell-gekoppelten, Fas-Liganden (FasL) an den TNF-Rezeptor oder TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) initiiert. Durch die Bildung eines Zelltod-induzierenden Signalkomplexes (DISC) wird über mehrere Zwischenschritte die Caspase-3 aktiviert, welche die Apoptose initiiert. Im intrinsischen Signalweg aktivieren beispielsweise Toxine (T) oder oxidativer Stress (O) die pro-apoptotische Bcl-2 Familie. Durch Interaktionen mit der anti-apoptotischen Bcl-2 Familie, wie beispielsweise Mcl-1, fällt deren Hemmung auf die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak weg. Diese führen durch Oligomerisation zur Porenbildung in der mitochondrialen Membran. Das austretende Cytochrom C bildet mit APAF1 durch Oligomerisation das Apoptosom. Zusätzlich austretendes SMAC/Diablo inhibiert Survivin, wodurch dessen Hemmung auf die Caspase 9 wegfällt. Schließlich erfolgt die Induktion der Apoptose über die Caspase-3. Modifiziert und erstellt mit biorender.com

## 3. Material und Methoden

---

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid Rotiphorese® Gel 40	Roth
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth
Annexin V	Miltenyi Biotec
Aqua dest.	BRAUN
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue®	Merck
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
EDTA	Applichem
Ethanol vergällt	Roth
FACS clean	Becton Dickinson
FACS flow	Becton Dickinson
Glycerin	Sigma-Aldrich
Glycin	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Michpulver Blotting grade, pulv., fettarm	Roth
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich
NEWBlot™ Nitro Strippingbuffer	Li-COR Biosciences
Nonidet® P40 (NP-40)	Fluka
PBS Dulbecco	Biochrom
Phosphatase Inhibitor	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure	Roth
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Mix (Complete™ Mini)	Roche
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Tris-Puffer	Roth

Tween® 20

Roth

### 3.1.2 Medium und Zusätze

Name	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium® (DMEM)	Roth
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom
Penicillin/Streptomycin	Gibco Life Technologies

### 3.1.3 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe Vacusafe	Integra
Blottinapparat Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad
CO <sub>2</sub> -Inkubator HeraCell150	Thermo Scientific
Durchflusszytometer FACSCanto™	BD Biosciences
Durchflusszytometer FACSCalibur™	BD Biosciences
Eisflockenbereiter AF 80	Scotsman
Elektrophoresekammer	Bio-Rad
Feinwage Basic	Sartorius
Gefrierschrank Liebherr GNP2713	Liebherr
Gefrierschrank VIP Series -86°C Ultra-Low-Temperature	SANYO
Gelgießapparat	Bio-Rad
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf
Kühlschrank 4°C Liebherr Comfort	Liebherr
Mikroskop Primovert	Zeiss
Mini-Centrifuge; Tischzentrifuge	Roth
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Pipet-X	Mettler Toledo
Pipette AutoRep E	Rainin
Pipet-Lite XLS (2 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Rainin
Rocking Platform	VWR
Rollenmischer RS-TR05	Phoenix Instruments
Rührplattform Variomag Mono	Thermo Scientific
Sonifizier-Gerät UP2200Ht ultrasonic processor	Hielscher

Spannungsquelle PowerPac™ HC	Bio-Rad
Sterilbank LaminAir HB2472	Thermo Scientific
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage Precisa Junior 500	Precisa
Wasseraufbereitungssystem PURELAB Classic	ELGA LabWater
Wasserbad AQUAline AL 5	Lauda
Western-Blot Odyssey®-Infrared Imaging System	Li-Cor Biosciences
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16	Thermo Scientific

### 3.1.4 Labormaterialien

Material	Hersteller
CELLStar® Zellkulturflaschen (40 mL, 200 mL)	Greiner Bio-one
CELLStar® 6-Well-Zellkulturplatten	Greiner Bio-one
CELLStar® 6cm Wells	Greiner Bio-one
CELLStar® Serologische Pipetten ( 5 mL, 10 mL)	Greiner Bio-one
Chromatography Paper Whatman™	GE Healthcare Life Science
Einmal-Skalpell	Feather
Einweghandschuhe Nitrile Powder-Free	Abena
FACS Röhrchen	Sarstedt
Falcon Tubes (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-one
Filter-Pinzette	Millipore
Glaswaren	Schott Duran
Mini PROTEAN® Glass Plates	Bio-Rad
Neubauer Zählkammer	Marienfeld-Superior Germany
Nitrocellulose Blotting Membrane	GE Healthcare Life Science
Pasteurpipetten	Roth
Pipette Tips Pipettenspitzen (10 µL, 200 µL, 1250 µL)	Greiner Bio-one
Rotilabo®-Mikrotitrierplatten	Roth
Safe-Lock Tubes 1,5 mL	Eppendorf
Serologische Messpipetten aus Glas	Hirschmann Instruments™



### 3.1.5 Marker

Marker	Hersteller
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas

### 3.1.6 Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Annexin V Puffer	10 mM HEPES/NaOH pH 7,4 140 mM NaCl 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> 0,1 % BSA
Blotpuffer	100 ml 5x Lämmli-Puffer 200 ml Ethanol 20% ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
Blockpuffer	5%iges Milchpulver in TBS-T
Bradford Reagenz	50 mg (0,01%) Coomassie Brilliant Blue® 25 mg (99,9%) Ethanol 50 ml Phosphorsäure ad 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
Net-N Lysepuffer	100 mM NaCl 10 mM Tris-Hcl pH8 10 % Glycerin 1 mM EDTA 0,5 % NP-40  Zusätzlich: Proteaseinhibitorcocktail-Tablette (1 Tablette/10 mL), Phosphataseinhibitor (1:100),
Propidiumiodid-Lösung	50 µg/mL PI in PBS
6x Probenpuffer nach Lämmli	375 mM Tris-Hcl pH 6,8 12 % SDS 30 % Glycerin 500 mM DTT 0,01 % Bromphenolblau
SDS-Elektrophoresepuffer	5x Lämmli-Puffer 10 % SDS
10x TBS-Puffer	20 mM Tris 1,4 M NaCl
TBS-T Puffer	10x TBS 0,05 % Tween®

### 3.1.7 Primäre Antikörper

Antikörper	Wirt	Verdün- nung	Katalog- nummer	Hersteller
ac-H3 <sup>(Lys14)</sup>	Kaninchen	1:1000	Milli 06-599	Millipore
α-Tubulin	Kaninchen	1:1000	Ab176560	Santa Cruz
ATM	Kaninchen	1:1000	Ab32420	Abcam
ATR	Kaninchen	1:1000	cs-2790S	Cell Signaling
B-Aktin	Maus	1:200	Sc-47778	Santa Cruz
CHK1	Maus	1:1000	cs-2360	Cell Signaling
CHK2	Kaninchen	1:1000	cs-2662	Cell Signaling
cl. Caspase 3	Kaninchen	1:500	cs-9661	Cell Signaling
cl. PARP1	Maus	1:1000	552596	BD Pharmigen
γ-H2AX <sup>(Ser139)</sup>	Kaninchen	1:500	cs-9718	Cell Signaling
GAPDH	Kaninchen	1:1000	Ab128715	Abcam
MCL-1	Kaninchen	1:500	sc-819	Cell Signaling
Noxa	Maus	1:500	OP180	Calbiochem
p21 <sup>(Cip1/Waf1)</sup>	Kaninchen	1:1000	Ab109520	Abcam
p53	Maus	1:1000	NCL-p53-CM5p	Novocastra
p-p53 <sup>(S15)</sup>	Kaninchen	1:1000	cs-2661	Cell Signaling
pATM <sup>(S1981)</sup>	Kaninchen	1:1000	ab81292	Abcam
pATR	Kaninchen	1:1000	GTX-128145	Genetex
p-CDK1 <sup>(Y15)</sup>	Kaninchen	1:1000	cs-4539S	Cell Signaling
p-CHK1 <sup>(S296)</sup>	Kaninchen	1:1000	cs-2349	Cell Signaling
p-CHK2	Kaninchen	1:500	cs-2661	Cell Signaling
pan-HSP90	Maus	1:1000	sc-13119	Cell Signaling
PR130	Kaninchen	1:2000	NBP1-87233	Novus
RAD51	Kaninchen	1:1000	Ab6380	Abcam
Survivin	Kaninchen	1:1000	Ab134170	Abcam
WEE1	Maus	1:200	Sc-5285	Santa Cruz

Sämtliche Antikörper wurden in 2 %-iger Trockenmilch in 5 mL TBS-T angesetzt und bei -20°C gelagert.

### 3.1.8 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung in TBS-T	Hersteller
IgG Kaninchen IRDye® 800CW	Esel	1:10000	Li-COR Biosciences
IgG Kaninchen IRDye® 680RD	Esel	1:10000	Li-COR Biosciences
IgG Maus IRDye® 800CW	Esel	1:10000	Li-COR Biosciences
IgG Maus IRDye® 680RD	Esel	1:10000	Li-COR Biosciences

### 3.1.9 Zytostatika

Zytostatikum	Stock Konzentration	Verwendete Konzentration
5-Fluoruracil	50 mM	5 µM
Hydroxyurea	10 mM	1 mM
Irinotecan	10 mM	5 µM
MS-275	5 mM	8 µM

### 3.1.10 Zelllinien

Zelllinie	Kultureigenschaft	Hersteller
HCT116 <sup>WT</sup>	Adhärente Zellen	ATCC
HCT116 <sup>p53 -/-</sup>	Adhärente Zellen	ATCC
HCT116 <sup>p21 -/-</sup>	Adhärente Zellen	ATCC
HCT116 PR130 CRISPR/Cas9 control	Adhärente Zellen	ATCC
HCT116 PR130 CRISPR/Cas9 Klon 3	Adhärente Zellen	ATCC
HCT116 PR130 CRISPR/Cas9 Klon 16	Adhärente Zellen	ATCC

### 3.1.11 Software

Name	Hersteller
Zotero	Corporation for Digital Scholarship
GraphPad Prism 6	GraphPad Software
LibreOffice Writer	The Document Foundation
Odyssey Software	Li-COR Biosciences
FACSDiva™ 7.0	BD Biosciences
Image Studio Lite V. 5.2	Li-COR Biosciences

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Auftauen der Zellen und Erhaltungskultur**

Sämtliche Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen und unter Verwendung steriler Materialien durchgeführt. Hierbei wurde unter einer Sterilwerkbank mit Handschuhen gearbeitet und das Material mittels eines Autoklaven sterilisiert. Die Desinfektion erfolgte mit 70%igem Ethanol.

Die Zellen wurden in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff mit 10%igem DMSO als Frostschutzmittel gelagert. Zum Auftauen wurden diese in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt und anschließend bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (1.000 rpm, 5 min). Mit Hilfe einer Pasteurpipette und einer Vakuumpumpe wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpelett anschließend in 5 ml warmen Medium resuspendiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Überführung in eine Zellkulturflasche, welche in den Begasungsbrutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> und 97% Luftfeuchtigkeit gestellt wurde. Nach ein bis zwei Wochen Inkubation konnten die Zellen für weitere Arbeiten verwendet werden.

Für die Erhaltungskultur wurden die Zellen bei 37 °C im Inkubator gelagert. Um eine starke Zunahme der Zelldichte und eine übermäßige Apoptose der Zellen zu verhindern, wurde das Zellmedium regelmäßig erneuert und die Kultur in einem Verhältnis von 1:10 gesplittet. Hierfür wurde das alte Medium vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gespült um FCS Rückstände zu entfernen. Damit sich die Zellen von der Zellkulturflasche lösten, wurden diese für etwa 10 min mit 500 µl Trypsin/EDTA inkubiert. Durch das Hinzugeben von 4,5 ml frischem Medium wurde die Reaktion gestoppt und die Zellen konnten gründlich resuspendiert und anschließend bis auf 0,5 ml abgesaugt werden. Für die weitere Kultivierung der Zellen wurden die Zellkulturflaschen auf 5 ml mit frischem Medium aufgefüllt und im Inkubator aufbewahrt. Die HCT116 wurden in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (10 U/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin) kultiviert.

### 3.2.2 Zellaussaat

Zur Vorbereitung wurden die Zellen wie in Punkt 1.2.1 abgelöst und anschließend sorgfältig resuspendiert um die Zellen möglichst in einer Einzelzellsuspension vorliegen zu haben. Von dieser Zellsuspension wurden 50 µl entnommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl PBS verdünnt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Hierfür wurden alle 4 Großquadranten gezählt und in folgende Formel eingesetzt um die Gesamtzellzahl pro ml zu berechnen:

$$\text{Zellen pro ml} = \frac{(\text{gezählte Zellen} * \text{Verdünnungsfaktor})}{\text{Anzahl gezählter Großquadrate}} * 10^4$$

### 3.2.3 Behandlung der Zellen mit Chemotherapeutika

Im Rahmen der Experimente dieser Promotionsarbeit wurden die Zellen sowohl einzeln mit Hydroxyurea (HU), Irinotecan (CPT-11) und 5-Fluoruracil (5-FU) sowie in Kombination mit dem HDAC Inhibitor Entinostat (MS-275) behandelt. Die Kombinationstherapie für die Zellen der jeweiligen Zelllinien erfolgte für sämtliche Experimente nach folgendem Schema:

Tab. 3: Schema für die Kombinationstherapie

Ctr.	MS-275	5-FU	5-FU + MS-275	CPT-11	CPT-11 + MS-275	HU	HU + MS-275
------	--------	------	---------------	--------	-----------------	----	-------------

Die Zytostatika lagen in Stocklösungen vor und wurden vor der Behandlung auf die jeweilig benötigten Konzentrationen (siehe 3.1.9) mit PBS verdünnt.

### 3.2.4 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Herstellung der Proteinextrakte wurden die Zellen, nach Berechnung der benötigten Menge, in 6-Well Platten ausgesät und für eine Nacht zur Adaption in den

Brutschrank gestellt. Anschließend erfolgte die Stimulationen der Zellen nach Schema (siehe 3.2.3 , Tabelle 3). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die behandelten Zellen unsteril auf Eis geerntet. Hierfür wurden sie in beschriftete 15 ml Falcons pipettiert. Danach wurden die Wells mit PBS gespült und ebenfalls in die Falcons überführt. Um die Zellen vom Boden abzulösen, wurden sie etwa 10 min mit Trypsin/EDTA behandelt und anschließend mittels des zuvor pipettierten Mediums in das jeweils entsprechende 15 ml Röhrchen überführt. Sämtliche weitere Arbeitsschritte wurden ebenfalls unsteril durchgeführt. Vor der Lyse der Zellen erfolgte ein Waschschrift. Bei Raumtemperatur wurden die Zellen hierfür 5 min bei 1.300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels einer Pasteurpipette und einer Pumpe abgesaugt. Das anschließend entstandene Pellet wurde mit 1 ml PBS resuspendiert und in beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (13.300 rpm, 5 min) bei 4 °C. Der Überstand wurde sorgfältig abgesaugt und das Pellet für 30 min auf Eis mit NET-N Lysepuffer inkubiert. Für die Menge des benötigten Lysepuffers galt hierbei als etwaiger Richtwert 100 µl Lysepuffer pro 1 Mio. Zellen. Nachfolgend wurden die Zellysate 10 s bei einer Amplitude von 10% und einer Power von 40% sonifiziert und anschließend ein weiteres Mal bei 4 °C zentrifugiert (13.300 rpm, 25 min). Dies diente der Entfernung unlöslicher Zellbestände. Im nächsten Schritt erfolgte eine Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 3.2.5 ) und ein Ausgleich der Proben auf eine einheitliche Proteinmenge mittels Aqua<sub>dest.</sub>. Dem Lysat wurde des Weiteren die berechnete Menge 6x Probenpuffer beigefügt und anschließend im Heizblock für 5 min bei 95 °C aufgekocht um die in der Probe enthaltenen Proteine zu denaturieren und zu linearisieren. Die fertigen Proben wurden beschriftet und bei -20°C im Gefrierschrank eingefroren. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Proben in den -80 °C Gefrierschrank umgelagert.

### **3.2.5 Bradford Proteinanalyse**

Zur quantitativen Bestimmung des Proteingehalts aus Gesamtzellysaten wurde in dieser Arbeit die photometrische Methode nach Bradford verwendet. Diese bedient sich der Eigenschaft des negativ geladenen Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-

250 sein Absorptionsmaximum durch Komplexbildung mit positiven Seitenketten der Proteine von 420 nm auf 595 nm zu verschieben. Da die Komplexbildung proportional zur vorliegenden Proteinmenge verläuft, kann unter Verwendung einer Standardreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen und auf Basis des Lambert-Beer'schen Gesetzes der Proteingehalt der Proben errechnet werden. Als interner Standard für die Eichgerade wurde BSA gewählt und gemäß Tabelle 4 vorverdünnt.

Tab. 4: Verdünnungsreihe BSA Standard

1 mg/ml BSA	Aqua <sub>dest.</sub> [µl]	Proteinkonzentration [µg/ml]
0	30	0
1,5	28,5	2,5
3	27	5
6	24	10
9	21	15
12	18	20
15	15	25

Die zu untersuchenden Proben wurden in einem Verhältnis von 1:10 ebenfalls vorverdünnt. Anschließend wurden auf eine 96 Well Platte jeweils 10 µl Probe und BSA Standard als Doppelbestimmung aufgetragen. Pro Well wurden zusätzlich 200 µl Bradford Reagenz hinzugefügt. Nachdem die Platte etwa 5 min bei RT und abgedunkelt inkubiert wurde, erfolgte die Messung am Photometer.

### 3.2.6 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Das Verfahren der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli wird verwendet um Proteingemische in einem elektrischen Feld nach ihrer Molekularmasse aufzutrennen. Die Auftrennung gelingt indem Proteine bei 95 °C denaturiert werden und das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) hinzugefügt wird. Dieses bindet an die freigelegten Polypeptidketten des Proteins und bildet somit einen negativ geladenen SDS-Protein-Komplex. Diese werden auf ein Gel, das aus Sammelgel und Trenngel besteht, aufgetragen. Wird ein

elektrisches Feld angelegt, so wandern die Komplexe durch die als Molekularsieb wirkende Polyacrylamidgelmatrix auf die Anode zu. Kleinere Moleküle wandern hierbei schneller weiter durch die Matrix, während größere SDS-Protein-Komplexe von dieser zurückgehalten werden und langsamer wandern. Somit ergibt sich eine leiterförmige Auftrennung des Proteingemisches, bei welcher die kleinsten Proteine die unterste Laufront bilden.

Die für die SDS-PAGE benötigten Gele wurden in der Regel einen Tag zuvor gegossen und bis zum Zeitpunkt der Verwendung mit feuchtem Zellstoff eingewickelt und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Hierfür wurden zwei Glasplatten mit einem Abstand von 1 mm oder 1,5 mm in der Gelgießvorrichtung mit einer Klemme zusammengebaut und mit dem zuvor zusammenpipettierten Trenngel-Gemisch (Tabelle 5) aufgefüllt. Es folgte eine direkt anschließende Beschichtung mit 1 ml Isopropanol um das Gel während dem Polymerisationsvorgang vor dem Austrocknen zu schützen und um gleichzeitig die Entstehung eines möglichst glatten Oberrands im Gel zu gewährleisten.

*Tab. 5: Trenngel Rezept*

<b>Gelkonzentration</b>	<b>15%</b>	<b>10%</b>	<b>7,5%</b>
Aqua <sub>dest</sub>	4,3 ml	5,7 ml	
1,5 M Tris pH 8,8		3 ml	
10% SDS (w/v)		120 µl	
Acrylamid	4,5 ml	3 ml	
10% APS (w/v)		60 µl	
TEMED		6 µl	

*Die angesetzte Menge ist ausreichend für 2 Gele mit 1mm Dicke*

Für den Nachweis kleinerer Proteine eignen sich Gele mit einem höheren Anteil Acrylamid besser, während für die Auftrennung von großen Proteine ein möglichst geringer Acrylamidgehalt gewählt werden sollte. Nach Abschluss der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol wieder vollständig entfernt und das Sammelgel-Gemisch (Tabelle 6) auf das Trenngel pipettiert und mit den entsprechenden Kämmen bis zum Eintritt der Polymerisation versehen.



Tab. 6: *Sammelgel Rezept*

	<b>Sammelgel</b>
Aquadest	4,4 ml
1 M Tris pH 6,8	760 µl
10% SDS (w/v)	60 µl
Acrylamid	760 µl
10% APS (w/v)	60 µl
TEMED	6 µl

*Die angesetzte Menge ist ausreichend für 2 Gele mit 1mm Dicke*

Die fertigen Gele wurden in Elektrophoresekammern gespannt und vollständig mit Elektrophoresepuffer befüllt. Es wurden pro Tasche 30 -40 µg Protein aufgeladen und für den Rückschluss auf die Proteingröße wurden 3,5 µl der angefärbten und standardisierten Proteinleiter *Page Ruler Plus* in die erste oder letzte Probestasche des Gels pipettiert. Unter einer konstanten Spannung von 95 V wurden die Proben durch das Sammelgel laufen gelassen. Hatten die Proteinlauffronten das Trenngel erreicht, so wurde die Spannung auf 125 V erhöht bis die Proteine vollständig durch das Gel gelaufen waren.

### **3.2.7 Western Blot**

Nach Abschluss der SDS-PAGE erfolgte das Western Blot Verfahren. Dies dient dem Transfer der Proteine um in einem späteren Schritt die Proteindetektion mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper zu ermöglichen. Zuerst werden unter Verwendung eines elektrischen Feldes Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Im Anschluss werden die Membranen mit spezifischen Antikörpern inkubiert um einzelne Proteine nachweisen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Tankblot Verfahren verwendet. Die Blotkammer wurde vollständig mit Blotpuffer aufgefüllt und wurde mit einer Blotkassette sowie einem Kühlakku zur Kühlung während des Blotting-Verfahrens versetzt. Die Blotkassette enthielt das „Blotsandwich“, welches wie folgend aufgebaut wurde: Die unterste Schicht bildete ein in Blotpuffer getränkter Schwamm. Danach wurden zwei in Blotpuffer getränkte Filterpapiere aufgelagert, es folgte die Nitrocellulosemembran und anschließend das proteinbeladene Elektrophoresegel. Darauf wurden erneut

zwei mit Blotpuffer getränkte Filterpapiere gelegt und zum Schluss folgte ein weiterer Schwamm. Alles wurde luftblasenfrei zusammengebaut. Die Kasette wurde anschließend so in die Blotkammer eingebaut, dass die Seite der Membran zur Anode zeigte. Durch das senkrecht zum Gel angelegte elektrische Feld wanderten die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe in Richtung der Anode und wurden auf die Membran transferiert. Es wurde eine Stromstärke von 350 mA pro Kammer gewählt und für 2h eingestellt. Danach wurden die Membranen 5 min schüttelnd mit TBST gewaschen. Dieser Schritt diente der Entfernung des SDS. Um eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern und die proteinfreien Flächen der Membranen zu sättigen, wurden die Membranen 1h schüttelnd mit 5% TM/TBST geblockt. Anschließend wurden die Nitrocellulosemembranen dreimal für 5 min mit TBST gewaschen um überschüssige Trockenmilchreste zu entfernen. Zur Detektion und Markierung der Proteine von Interesse wurden die Membranen mit spezifischen primären Antikörpern bei 4°C über Nacht auf Rollenmischern inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Membranen erneut dreimal mit TBST gewaschen um ungebundene Antikörper zu entfernen. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit sekundären Antikörpern in abgedunkelten 50 ml Falcons bei RT für 2h. Diese grün oder rot fluoreszenz-gekoppelten Antikörper binden an das Fc-Fragment der primären Antikörper. Da multiple sekundären Antikörper an den Fc-Regionen eines primären Antikörpers binden können, erfolgt dadurch eine Signalverstärkung. (Heinrich et. al., 2014) Mit Hilfe des Odyssey® Imaging Systems konnten diese Signale gemessen und dargestellt werden. Die Analyse erfolgte anschließend mittels der Image Studio Lite Software.

### **3.2.8 Durchflusszytometrische Analysen**

Mittels durchflusszytometrischer Methoden ist es möglich eine große Anzahl an Zellen in kurzer Zeit zu analysieren (etwa 1.000 Zellen/sec). Das Verfahren basiert darauf, dass Zellen mit hoher Geschwindigkeit durch eine Kapillare fließen und dabei von einem Laserstrahl erfasst werden. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter channel, FCS*) gibt Aufschluss über die Größe der Zelle. Hierbei wird die Zeit gemessen, die die Zelle benötigt um den Laserstrahl zu passieren. Die benötigte

Passagezeit steigt proportional zur Größe der Zelle an. Im Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter channel*, SSC) kann die Granularität der Zelle bestimmt werden. Je stärker die Streuung, desto höher ist die Granularität der Zellen.

Mittels Fluoreszenzfarbstoffen und fluoreszenzgekoppelten Antikörpern können bestimmte Proteine und Zellstrukturen markiert und analysiert werden. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff durch spezifische Laser zum Leuchten gebracht. Anhand der Intensität lassen sich Rückschlüsse auf DNA Gehalt, Proteingehalt und Proteinmodifikation ziehen (Basiji et al. 2007).

Sämtliche Messungen erfolgten am FACS Canto II und wurden anschließend mit der Software FACSDiva™ ausgewertet.

### **3.2.8.1 Zellzyklusanalysen**

Zur Analyse des Zellzyklus wurden 300.000 Zellen/ml in 2 ml einer 6-Well Platte ausgesät und nach Schema (siehe 1.2.3) behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 24h, 40h oder 48h wurden die Zellen unsteril auf Eis geerntet und direkt in ein FACS Röhrchen überführt. Nach einem ersten Zentrifugationsschritt (1.300 rpm; 5 min) wurde das Medium mit einer Pasteurpipette und Pumpe abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Es folgte ein zweiter Zentrifugationsschritt (1.300 rpm; 5 min) nach dem erneut der Überstand abgesaugt wurde und das Pellet anschließend in 100 µl kaltem PBS resuspendiert wurde. Anschließend wurden 2 ml 80%-iger EtOH, der bei -20 °C gelagert wurde, tröpfchenweise und langsam schüttelnd auf einem Vortexer hinzupipettiert. Dadurch wurden die Zellen fixiert und wurden anschließend mindestens 1h, meistens jedoch über Nacht, bei 20 °C gelagert. Nachdem die Zellen vollständig permeabilisiert waren, erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (1.300 rpm, 5 min) und das Absaugen des Überstandes. Die Zellen wurden im Anschluss 1h bei RT mit einer Lösung aus PBS und Rnase (1 µl Rnase A (SL 10 mg/ml) auf 333 µl PBS) inkubiert, bevor sie mit 164 µl Propidiumiodid-Lösung (PI) (SL: 50 µg/ml PBS) gefärbt und am Durchflusszytometer gemessen wurden.

PI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA von Zellen interkalieren kann nachdem die Zellmembran perforiert wurde. Die gemessene Intensität des PI vermittelten Signals steht proportional zum DNA Gehalt der Zelle und kann somit zur Diskriminierung der Zellviabilität und des Zellzyklus dienen. In der postsynthetischen G2 Phase liegt die DNA bereits als Vorbereitung auf die Mitose doppelt in der Zelle vor ( $4n$ ), sodass in dieser Phase folglich die höchste PI emittierte Intensität gemessen werden kann. Absteigend folgen die S-Phase (Replikation der DNA) und G1 Phase (einfaches Vorliegen der DNA,  $2n$ ). Die subG1-Fraktion wird von der Zellpopulation mit apoptotisch fragmentierter DNA gebildet und weist das geringste Fluoreszenzsignal auf.

### **3.2.8.2 Zelltodmessung mittels AnnexinV-FITC/PI Färbung**

Mittels einer an das Fluorochrom *Fluorisoithiocyanite* (FITC) gekoppelten Färbung mit AnnexinV ist es möglich den apoptotischen Zellanteil einer Population zu detektieren. Das Protein AnnexinV bindet in Gegenwart von Calcium Ionen an das in der Zellmembran vorhandene Phosphatidylserin. Während Phosphatidylserin in viablen Zellen an der inneren Zellmembran verankert ist, wandert es während der frühen Apoptose an die äußere Zellmembran und steht AnnexinV-FITC als Bindungsstelle zur Verfügung. Um zwischen der frühen und der späten Apoptose/Nekrose unterscheiden zu können, erfolgt eine Doppelfärbung mit PI. PI ist es nicht möglich durch die intakte Zellmembran durchzudringen, sondern lediglich durch apoptotisch permeable Membranen. Folglich werden nur Zellen in der späten Phase der Apoptose, deren Zellmembran poröse Anteile aufweist, von PI markiert. Die Differenzierung der Populationen erfolgt mittels durchflusszytometrischer Analysen. Viable Zellen sind demnach AnnexinV und PI negativ, früh-apoptotische Zellen nur AnnexinV positiv und spät-apoptotisch/nekrotische Populationen AnnexinV und PI positiv (Vermees et al. 1995; Wallberg, Tenev, and Meier 2016).

Zur Untersuchung der Zelltodmessung wurden 300.000 Zellen/ml in 2 ml einer 6 Well Platte ausgesät und nach Schema mit den gewünschten Zytostatika behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen unsteril auf Eis geerntet und in jeweils beschriftete FACS Röhrchen überführt. Es erfolgte ein erster Zentrifugationsschritt

(1.300 rpm, 5 min) nach welchem der Überstand mit einer Pasteurpipette und einer Pumpe abgesaugt wurde. Das entstandene Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (1.300 rpm, 5 min). Im nächsten Schritt wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Zellen in 50 µl 1x AnnexinV-Bindepuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit 2,5 µl AnnexinV-FITC und die Zellen wurden 30 min auf Eis und abgedunkelt inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Färbung mit PI (430 µl 1x AnnexinV-Bindepuffer und 10 µl PI) und die sofortige Messung der Proben am Durchflusszytometer.

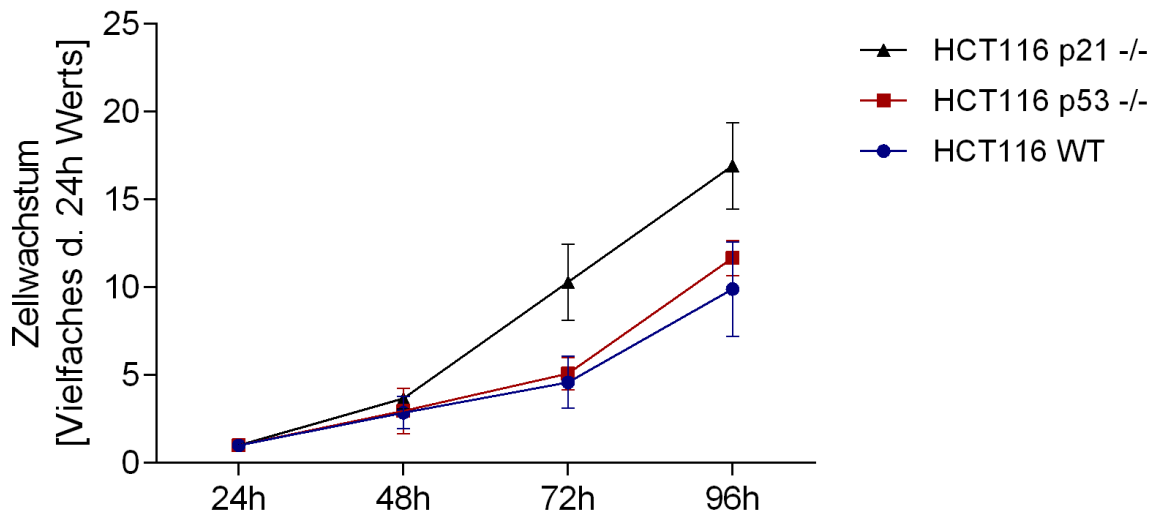
### **3.2.9 Statistische Analysen**

Sämtliche statistischen Analysen wurden mit Hilfe der GraphPad Prism 6 Software durchgeführt und auf Signifikanz untersucht. Die statistischen Tests wurden den jeweiligen Experimenten entsprechend ausgesucht. Die Verteilung der Signifikanzen entspricht wie folgend: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  und \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Wachstumsverhalten der HCT116 Zelllinien

Das für den Tumorsuppressor p53 kodierende Gen *TP53* ist in Kolonkarzinomzellen häufig von Mutationen betroffen. Wie bereits aus der Literatur bekannt ist, spielen p53 und sein *downstream target* p21 maßgebliche Rollen in der Zellzyklusregulation und Apoptoseinduktion (Roos, Thomas, and Kaina 2016; Armaghany et al. 2012). Daher wurden zu Beginn dieser Arbeit, mittels einer Wachstumskurve, die Wachstumsprofile und das Proliferationsverhalten zwischen den Zellreihen HCT116 Wildtyp (HCT116<sup>WT</sup>), HCT116 p53 knockout (HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup>) und HCT116 p21 knockout (HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup>) ermittelt und verglichen.



**Abb. 6: Wachstumskurve der verwendeten HCT116 Zelllinien**

Die Zellen der Zellreihen HCT116<sup>WT</sup>, HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> und HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> wurden unbehandelt und gleichmäßig in eine 12 Well Platten ausgesät. Die Ernte und Auszählung der Zellen erfolgte nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h. Die Werte wurden auf den 24 h Wert normalisiert und der MW+SD graphisch dargestellt (n=3).

Wie Abb. 6 darstellt, weisen die Zelllinien innerhalb der ersten 24 h weitestgehend parallel verlaufende Wachstumsgeschwindigkeiten auf. Während die Zellreihen HCT116<sup>WT</sup> und HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> weiterhin annähernd ähnliche Verdopplungszeiten aufwiesen, zeigte sich bei den HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zellen ab 48 h eine deutliche Beschleunigung des Zellwachstums. Zum 72 h Zeitpunkt hatte sich die Gesamtzellzahl der HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Population gegenüber den anderen beiden Zelllinien bereits verdoppelt. Bei den HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Zellen konnten im Vergleich zu der Wildtyp Zellreihe nach 72 h ebenfalls eine geringfügig erhöhte Proliferationsrate gezeigt werden, die im weiteren Zeitverlauf zunahm. Um ähnliche Phasen der Zellteilung und des Zellzyklus zu treffen und somit eine bessere Vergleichbarkeit der zellulären Antwort auf replikativen Stress zu erlangen, wurden für die nachfolgenden Experimente die Messungszeitpunkte 24 h und 48 h gewählt.

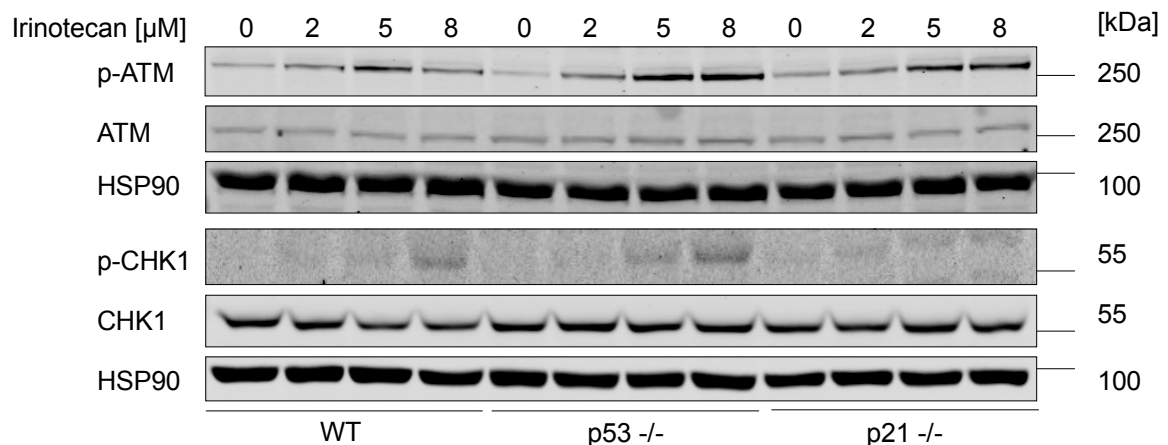
## **4.2 Charakterisierung der Zytostatika Irinotecan, 5-Fluoruracil und Hydroxyurea**

Irinotecan, 5-Fluoruracil und Hydroxyurea sind bereits von der *Food and Drugs Administration (FDA)* zugelassene und etablierte Medikamente der Tumorthherapie. Auf Grund von Tumorzellmutationen und steigenden Inzidenzraten an Arzneimittelresistenzen ist die moderne Tumorthherapie bemüht neue Substanzen sowie neue Kombinationsbehandlungen in ihre Therapieschemata zu integrieren (Longley, Harkin, and Johnston 2003; Madaan, Kaushik, and Verma 2012; Bailly 2019). In den nachfolgenden Experimenten werden daher anhand von Konzentrationsreihen das Ansprechen der Zellen auf diese Medikamente einzeln getestet um im nächsten Schritt die Wirkmechanismen der Zytostatika in Kombination mit dem HDAC-Inhibitor Entinostat (MS-275) zu überprüfen.

### **4.2.1 Irinotecan**

Irinotecan ist ein Topoisomerase I Inhibitor und findet Gebrauch in der Erstlinientherapie des metastasierten Kolorektalen Karzinoms (Ärzteblatt 2002). Zur

genauerer Untersuchung der zellulären Antwort auf Irinotecan wurden die Zellen zu Beginn mit unterschiedlichen Irinotecan Konzentrationen behandelt. Ziel dieser Konzentrationsreihe war die Darstellung der Dosiswirkung auf die verschiedenen Zellreihen und die Schwelle der beginnenden DNA Schadensantwort Aktivität festzustellen. Hierfür wurden die Proteine Ataxia Teleangiectasia Mutated (ATM) und CHK1 mit ihren jeweilig durch Phosphorylierung aktivierten Formen (p-ATM und p-CHK1) gewählt und via Western Blot nachgewiesen (siehe Abb. 7).



**Abb. 7: Dosiswirkung von Irinotecan auf die HCT116 Zelllinien**

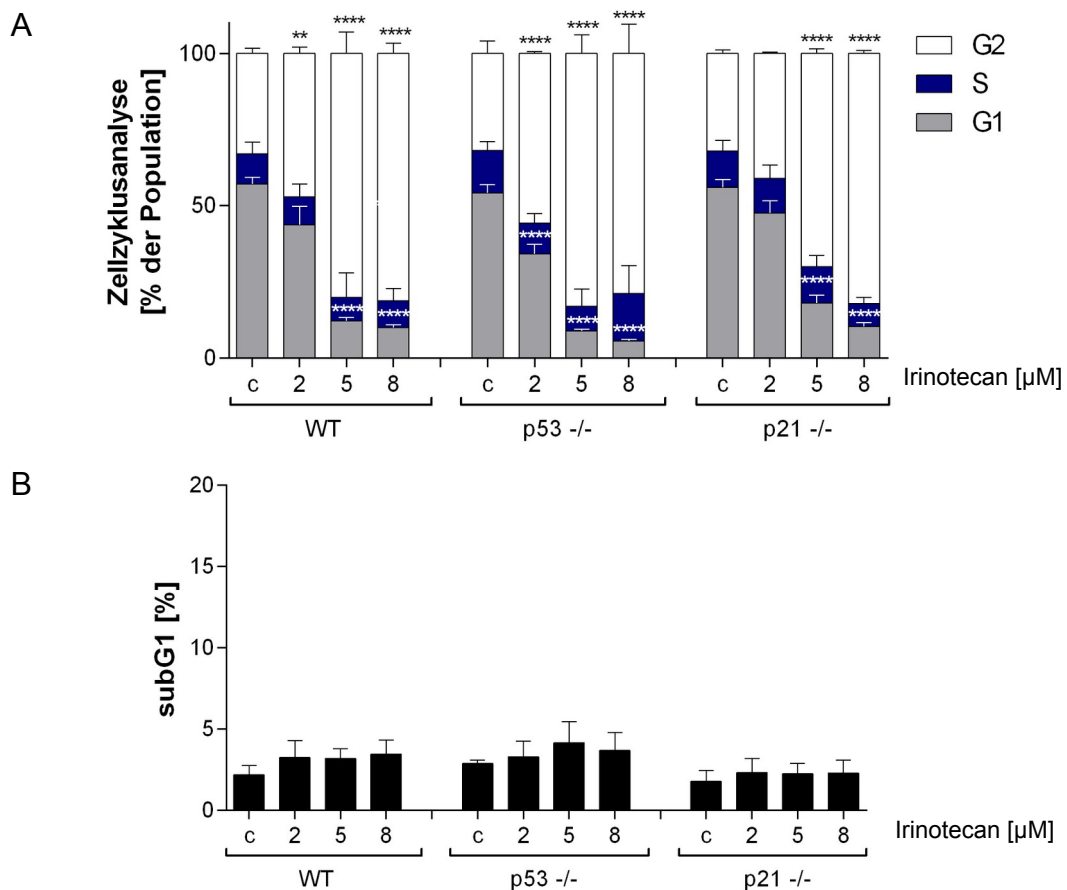
Irinotecan wurde in steigender Konzentration (2 μM, 5 μM, 8 μM) für 24h an den humanen Kolonkarzinomzellen HCT116<sup>WT</sup>, HCT116<sup>p53 -/-</sup> und HCT116<sup>p21 -/-</sup> getestet. Gesamtzellextrakte wurden mittels Western Blot getestet. HSP90 dient als Ladekontrolle (n=2).

ATM zählt zu den früh reagierenden Sensoren der DDR und wird, als Reaktion auf Doppelstrangbrüche in der DNA, phosphoryliert. Dadurch ist die Darstellung von pATM als Marker für beginnenden replikativen Stress möglich (Roos, Thomas, and Kaina 2016). Aus den Experimenten geht hervor, dass das stärkste p-ATM Signal in den HCT116<sup>p53 -/-</sup> Zellen zu beobachten ist. Die ATM Expression bleibt in allen drei Zelllinien, sowohl in den unbehandelten Kontrollzellen als auch unter Dosissteigerung mit Irinotecan, weitgehend unverändert. Erste p-ATM Aktivitäten sind bereits ab einer Konzentration von 2 μM und 24 h beobachtbar. Eine deutliche Phosphorylierung von ATM in allen drei Zellpopulationen ist jedoch erst bei einer Konzentration von 5 μM und 24 h zu erkennen. Da höhere Konzentrationen in der HCT116<sup>WT</sup> Zellreihe wiederum zu einem Rückgang von p-ATM Expression führt, wurde eine Dosis von 5 μM Irinotecan für nachfolgende Experimente gewählt.

Um Zellaktivitäten in Folge von DNA Einzelstrangbrüchen nachzuweisen, wurden die Checkpoint Proteine CHK1 und ihre an Ser296 phosphorylierte Form p-CHK1 via



Western Blot nachgewiesen (Roos, Thomas, and Kaina 2016). Es konnte keine starke Zu- oder Abnahme von CHK1 innerhalb der Zelllinien und der Dosisreihe festgestellt werden. Als ein Hinweis auf eine beginnende Schadensantwort konnte ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  nach 24 h vorerst eine Phosphorylierung von CHK1 via Western Blot detektiert werden. Ein deutlicheres Signal konnte bei einer Konzentration von 8  $\mu\text{M}$  in den HCT116<sup>WT</sup> und HCT116<sup>p53 -/-</sup> nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu konnte in HCT116<sup>p21 -/-</sup> mit den in diesem Experiment verwendeten Konzentrationen und innerhalb von 24 h keine ausschlaggebende p-CHK1 Induktion gemessen werden. Die untersuchten Proteine zeigten Hinweise auf die Wirksamkeit des Topoisomerase I Inhibitors. Aus diesem Grund wurde zur weiteren Darstellung möglicher Effekte von Irinotecan auf den Zellzyklus eine Analyse am Durchflusszytometer durchgeführt (Abb. 8).

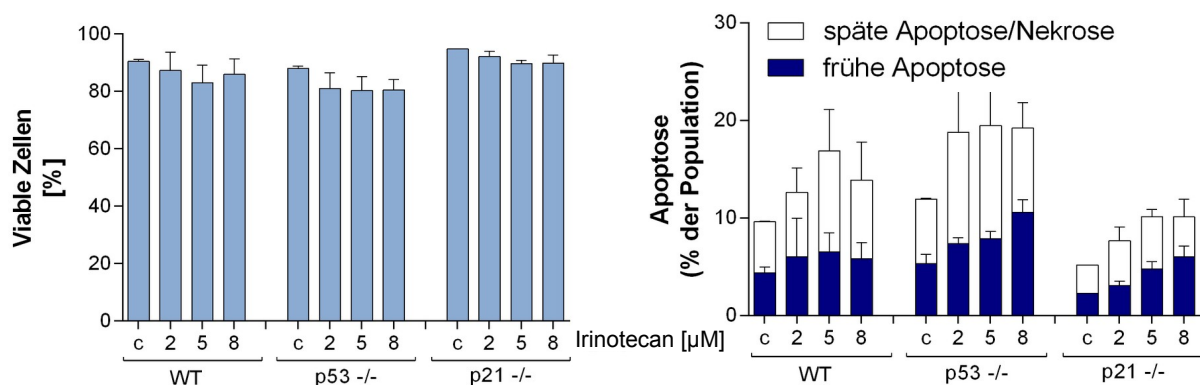


**Abb. 8: Zellzyklusverteilung der mit Irinotecan inkubierten HCT116 Zelllinien**

HCT116<sup>WT</sup>, HCT116<sup>p53 -/-</sup> und HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zellen wurden für 24 h Stunden mit steigenden Irinotecan Konzentrationen behandelt. Die Zellen wurden fixiert und mit PI gefärbt. Die Zellzyklusanalyse erfolgte am Durchflusszytometer. **(A)** Die subG1-Fraktion wurde von der Gesamtpopulation subtrahiert und die verbleibende Population auf 100% gesetzt. (n=3; MW + SD; two-way ANOVA, Bonferroni Korrektur; \*\* p $\leq$ 0,01; \*\*\*\* p $\leq$ 0,0001) **(B)** Darstellung der subG1-Fraktion (n=3; MW + SD; one-way ANOVA, Bonferroni Korrektur).

Durch die Behandlung mit Irinotecan ist in allen drei Zelllinien im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen ein gradueller G1-Phase Verlust zu erkennen. Insbesondere ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  ist eine ubiquitäre und signifikante Reduktion der G1-Phase von etwa 50% auf knapp 10% zu sehen. Im Vergleich hierzu steigt die G2-Phase in den behandelten Zelllinien bei einer Dosis von 5  $\mu\text{M}$  im Mittel um 45.4% an. Der höchste G2 Populationsanteil ist mit 76,1% in den HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zellen bei einer Dosis von 8  $\mu\text{M}$  Irinotecan zu detektieren (vgl: HCT116<sup>WT</sup> mit 75.2% und HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> mit 72.3%). Zusätzlich wird in der Abb. 8 gezeigt, dass in der HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zelllinie eine Reduktion der S-Phase bei 8  $\mu\text{M}$  von 11.2% auf 7%, während in den HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Zellen bei gleicher Konzentration ein Anstieg von 7.5% auf 14.6% zu finden ist.

Die subG1-Fraktion ist in allen drei Zelllinien gering ausgeprägt (unter 5%) und steigt auch mit zunehmender Irinotecan Konzentration nicht signifikant an. Auch bei der sensitiveren Methode der Zelltodmessung mittels AnnexinV/PI zur Differenzierung zwischen früher Apoptose und später Apoptose/Nekrose konnten keine statistisch signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen gezeigt werden (Abb. 9). Auffallend ist die im Vergleich zu den HCT116<sup>WT</sup> und den HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Zelllinien niedrigere Gesamtapoptose der HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Population. Dies ist ein möglicher Hinweis auf eine erhöhte Robustheit der HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zellen im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien.

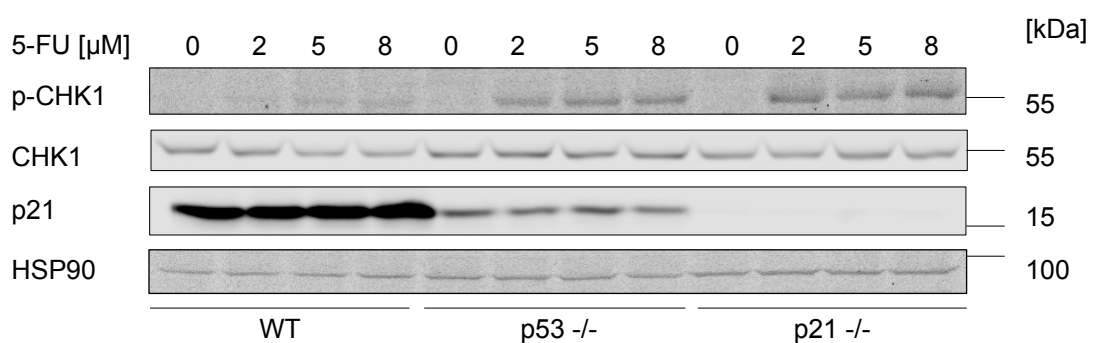


**Abb. 9: Zelltodmessung der mit Irinotecan behandelten HCT116 Zelllinien**

HCT116 Zellen wurden mit steigender Dosis Irinotecan für 24 h inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit AnnexinV-FITC und PI und die Analyse am Durchflusszytometer. (n=2, MW + SD; two-way ANOVA; Bonferroni Korrektur).

## 4.2.2 5-Fluoruracil

Das Antimetabolit 5-Fluoruracil (5-FU) findet als fester Bestandteil bereits etablierter adjuvanter Kombinationstherapien wie dem FOLFOX Schema<sup>1</sup> bei Kolonkarzinomen ab dem UICC Stadium III<sup>2</sup> oder als Monotherapie ab UICC Stadium II<sup>3</sup> Verwendung (Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) 2019). Zur genaueren Untersuchung der zellulären Antwort und der durch 5-FU ausgelösten Signalkaskaden wurden die Zellen zu Beginn mit unterschiedlichen 5-FU Konzentrationen behandelt.



### Abb. 10: Dosiswirkung von 5-Fluoruracil auf HCT116 Zelllinien

5-FU wurde in steigender Konzentration (2 μM, 5 μM, 8 μM) für 24 h an HCT116<sup>WT</sup>, HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> und HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> getestet. Gesamtzellextrakte wurden mittels Western Blot getestet. HSP90 dient als Ladekontrolle (n=2).

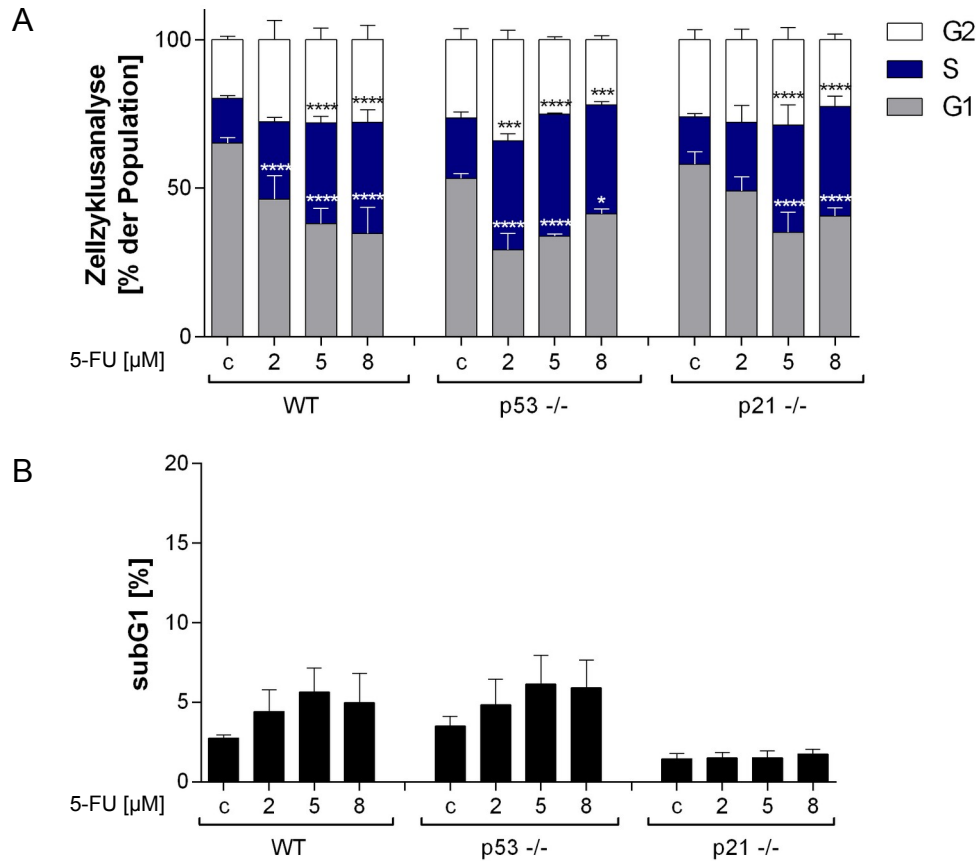
Es erfolgte nach den Ergebnissen in 4.2.1 direkt die Messung des *downstream targets* von ATM, die Proteine CHK1/p-CHK1 via Western Blot. Abb. 10 zeigt einen Nachweis der Phosphorylierung von CHK1 ab einer Konzentration von 2 μM 5-FU nach 24 h in den Zellreihen HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> und HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup>. In der HCT116<sup>WT</sup> Zelllinie ist eine leichte Phosphorylierung von CHK1 ab einer Konzentration von 5 μM 5-FU nach 24 h messbar. Insgesamt zeigt die HCT116<sup>WT</sup> Zelllinie jedoch deutlich verminderte Phosphorylierungen von CHK1 im Vergleich zu den knockout Zelllinien. Während das basale CHK1 Signal in den Kontrollen aller drei Zelllinien annähernd gleich stark detektierbar ist, verliert die Signalstärke innerhalb der HCT116<sup>WT</sup> Zelllinie

- 1 FOLFOX Schema: Folsäure + 5-Fluoruracil + Oxaliplatin
- 2 UICC (Union for International Cancer Control) ist ein international anerkanntes Tumorklassifikationssystem, das auf anatomischer Lage und Expansion des Tumors, Lymphknotenbefall und Metastasierung basiert. Stadium III entspricht bei Kolonkarzinomen einem Tumor jeglicher lokaler Größe mit einem Lymphknotenbefall von 1- 7 regionären Lymphknoten ohne Metastasenbildung.
- 3 UICC Stadium II entspricht lokalen Tumoren des Kolons jeglicher Größe ohne Lymphknotenbefall und ohne Metastasenbildung.

mit steigender 5-FU Konzentration an Intensität. In der Abb. 10 ist zu sehen, dass die CHK1 Proteinsignatur in den HCT116<sup>p53</sup> <sup>-/-</sup> Zelllinien im Gesamten etwas stärker ausgeprägt ist als in den anderen beiden Zelllinien.

Zusätzlich wurde das Protein p21 untersucht, welches eine Rolle für den Zellzyklusarrest in Gegenwart von DNA schädigenden Substanzen spielt. p21 wird von dem *CDKN1A* Gen auf Chromosom 6 kodiert und ist ein nachgeschaltetes Ziel des *TP53* Gens. Somit ist die basale und induzierte p21 Expression maßgeblich von der p53 Proteinaktivität abhängig (Gartel and Radhakrishnan 2005). In Abb. 10 kann diese Beobachtung klar gezeigt werden. Das Signal von p21 ist in den HCT116<sup>WT</sup> Zellen deutlich stärker ausgeprägt als in der HCT116<sup>p53</sup> <sup>-/-</sup> Zelllinie. Die Regulierung der p21 Expression ist jedoch nicht allein von p53 abhängig, sondern findet beispielsweise auch, als Reaktion auf genotoxischen Stress, auf post-transkriptioneller Ebene statt (Butz et al. 1998) oder kann über andere Signalwege und Genabschnitte, wie beispielsweise *BRCA1* (Somasundaram et al. 1997), induziert werden. Diese Vorgänge liefern eine mögliche Erklärung, weshalb in den HCT116<sup>p53</sup> <sup>-/-</sup> Zellen weiterhin geringe Level an p21 Signalen gemessen werden können. In den HCT116<sup>p21</sup> <sup>-/-</sup> ist gemäß den Spezifikationen einer knockout Zelllinie kein p21 messbar (Abb. 10).

Die untersuchten Proteine lieferten erste Hinweise auf beginnende DNA Schadensreparaturen und Zellzyklusarrest. Zur genaueren Darstellung der Effekte von 5-Fluoruracil auf den Zellzyklus wurde im anschließenden Schritt eine Analyse am Durchflusszytometer durchgeführt (Abb.11).



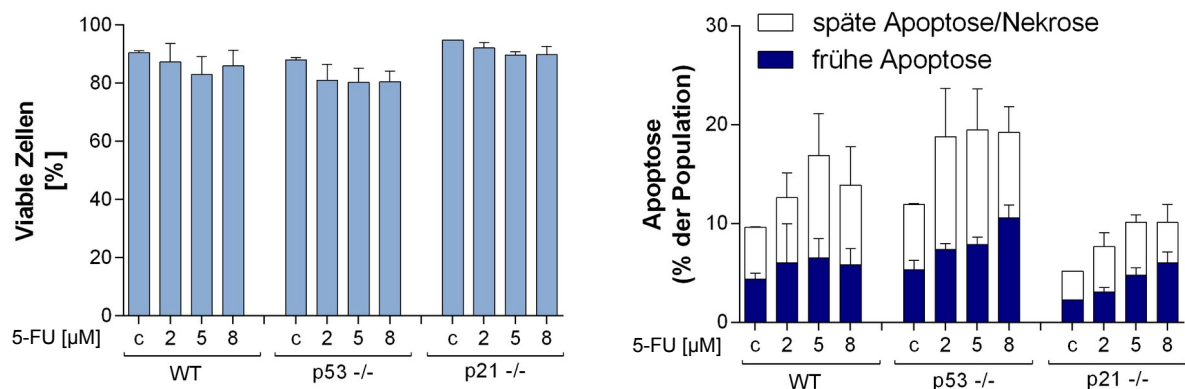
**Abb. 11: Zellzyklusanalyse der mit 5-Fluoruracil behandelten HCT116 Zelllinien**  
HCT116<sup>WT</sup>, HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> und HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zellen wurden für 24 h Stunden mit steigenden 5-FU Konzentrationen behandelt. Die Zellen wurden fixiert und mit PI gefärbt. Die Zellzyklusanalyse erfolgte am Durchflusszytometer. **(A)** Die subG1-Fraktion wurde von der Gesamtpopulation subtrahiert und die verbleibende Population auf 100% gesetzt. (n=3; MW + SD; two-way ANOVA, Bonferroni Korrektur; \* p<0,05; \*\*\* p≤0,001; \*\*\*\* p≤0,0001) **(B)** Darstellung der subG1 Population (n=3; MW + SD; one-way ANOVA, Bonferroni Korrektur).

Abbildung 11 zeigt, dass mit steigender 5-FU Konzentration in den HCT116<sup>WT</sup> Zellen ein gradueller G1-Phase Verlust mit einem zunehmenden S-Phase Arrest zu beobachten ist. Ab einer Konzentration von 2 μM 5-FU nach 24 h ist die G1-Phase von 65% bereits auf 46% abgesunken, bei einer Konzentration 5 μM 5-FU ist sie um 27% gesunken und sinkt auch bei 8 μM 5-FU kontinuierlich weiter ab. Die S-Phase steigt erst ab einer Konzentration von 5 μM 5-FU nach 24 h signifikant an. Hierbei nimmt der Anteil der S-Phase Population um mehr als das Doppelte zu, von 15% in der Kontrolle auf 34% in den behandelten Zellen (Abb.11A). Ähnliche Ergebnisse liefern auch die mit 5-FU behandelten HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zellen. Die G1-Phase sinkt bis zu einer Dosis von 5 μM 5-FU konstant ab und erreicht bei einer Konzentration von 5 μM 5-FU nach 24 h eine Reduktion um 23%. Bei höheren Konzentration steigt die G1 Phase wieder geringfügig an (um 5%). Nach einer Behandlung mit 5 μM und 8 μM 5-

FU nach 24 h kann ein S-Phase Anstieg auf 36% bis 37% detektiert werden. Im Vergleich zur Kontrolle (16%) hat sich die S-Phase Population in den HCT116<sup>p21 -/-</sup> ebenfalls mehr als verdoppelt (Abb. 11A). In der HCT116<sup>p53 -/-</sup> Zelllinie sinkt die G1 Population bei einer Dosis von 2 µM 5-FU nach 24 h von 53% auf 29%. Im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien steigt die G1-Phase jedoch mit ansteigender 5-FU Konzentration wieder um 5% bis 6% im Mittel an (Abb. 11A). Der höchste S-Phase Anteil der HCT116<sup>p53 -/-</sup> pendelt sich bei einer Behandlung mit 5 µM 5-FU nach 24 h mit 41% ein und sinkt danach wieder ab.

Die subG1-Fraktion gibt Hinweise auf induzierte Apoptose, da es die von DNase fragmentierte DNA Population im Zellzyklus darstellt. In der Abb. 11B kann jedoch kein signifikanter Anstieg an subG1 detektiert werden. Es lässt sich jedoch kongruent zu den Irinotecan Daten (siehe 4.2.1) eine geringe Induktion der subG1-Fraktion in der HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zelllinie nachweisen, die auch mit steigender 5-FU Konzentration kaum ansteigt (Abb. 11B).

Zur genaueren Untersuchung der Apoptose wurde ebenfalls eine AnnexinV/PI Analyse am Durchflusszytometer durchgeführt (Abb. 12). Abbildung 8 zeigt, dass der Anteil von apoptotischen Zellen in der HCT116<sup>WT</sup> Zelllinie nach 24 h von 5% in der Kontrolle auf 36% bis 48% in der mit 5-FU behandelten Population anstieg. Die Verteilung zwischen früher und später Apoptose entspricht jeweils in etwa der Hälfte. Die Induktion der Apoptose in den HCT116<sup>p53 -/-</sup> um 10% und in den HCT116<sup>p21 -/-</sup> um 4% unter Behandlung mit 5-FU ist vergleichbar mit den Irinotecan Ergebnissen (siehe 4.2.1). Die statistische Auswertung der Daten zeigte keine Signifikanz.

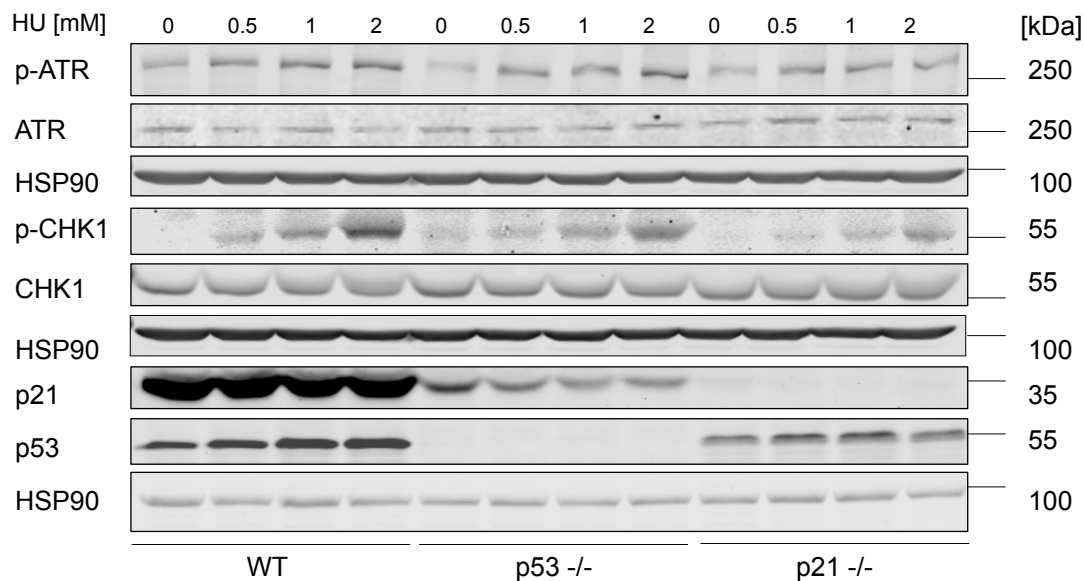


**Abb. 12: Zelltodmessung der mit 5-Fluoruracil behandelten HCT116 Zelllinien**  
HCT116 Zellen wurden mit steigender Dosis 5-FU für 24 h inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit AnnexinV-FITC und PI und die Analyse am Durchflusszytometer. (n=2, MW + SD; two-way ANOVA; Bonferroni Korrektur).

### 4.2.3 Hydroxyurea

Zurzeit ist HU in der Krebstherapie von der US-amerikanischen *Food and Drugs Administration (FDA)* lediglich zur Therapie von myeloischen und hämatologischen Tumorerkrankungen, sowie Plattenzellkarzinomen, zugelassen, nicht aber zur Therapie von Kolonkarzinomen (FDA, 2019). Zur Untersuchung von HU als potenzielles Medikament in der Therapie von Kolonkarzinomen wurden im Rahmen dieser Dissertation Experimente mit HU in verschiedenen HCT116 Zelllinien durchgeführt. Die Versuchsprotokolle für diese Arbeit wurden basierend auf den bereits publizierten Daten von Göder et al. (2018) entwickelt.

Das Zytostatikum HU inhibiert die Ribonukleotidreduktase, welche Ribose in Desoxyribose reduziert. Dies führt zu einer Störung der DNA-Replikation durch Blockierung der Replikationsgabel und ihrem subsequents Zusammenbruch (Timson 1975). Aus diesem Grund wurden zu Beginn Zielproteine der DNA-Schadensantwort via Western Blot untersucht. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an HU für 24 h inkubiert und auf ATR/CHK1 Aktivität untersucht (Abb. 13). Abbildung 13 zeigt, dass phosphoryliertes ATR in den HCT116<sup>WT</sup> und HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Zellen stärker ausgeprägt ist als in der HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zelllinie. Während in den HCT116<sup>WT</sup> das Signal ab 0,5 mM HU nach 24 h annähernd gleich bleibt, ist in den HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> bei 2 mM HU nach 24 h die stärkste Phosphorylierung von ATR zu detektieren (Abb. 13). Mit zunehmender HU Konzentration steigt auch die Phosphorylierung des CHK1 Signals in allen drei Zelllinien an. In den HCT116<sup>WT</sup> und HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Kontrollpopulationen ist keine pCHK1 Aktivität messbar. Das basale Signal der Proteine ATR und CHK1 bleibt auch bei zunehmender HU Konzentration in Western Blot Analysen annähernd konstant (Abb. 13).



**Abb. 13: Dosiswirkung von HU auf HCT116 Zelllinien**

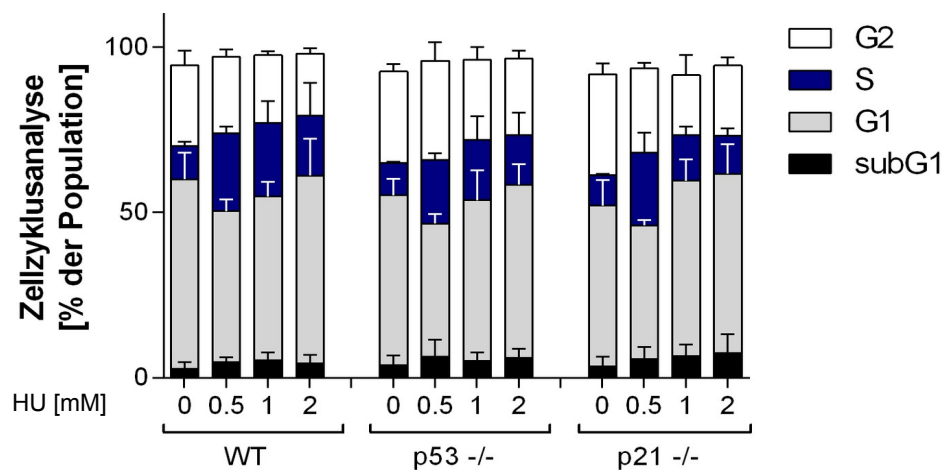
HU wurde in steigender Konzentration (0,5 mM; 1 mM; 2 mM) für 24 h an den humanen Kolonkarzinomzellen HCT116<sup>WT</sup>, HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> und HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> getestet. Gesamtzellextrakte wurden mittels Western Blot getestet. HSP90 dient als Ladekontrolle (n=2).

Zusätzlich wurden die Zellzyklus *Checkpoint* Proteine p53 und p21 via Western Blot detektiert (Abb. 13). In Abbildung 13 ist klar zu erkennen, dass p21 in der HCT116<sup>WT</sup> Zelllinie stärker exprimiert wird als in der HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Zelllinie. Auch die Intensität des p53 Signals ist in den HCT116<sup>WT</sup> Zellen höher gegenüber den HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zellen und ist in den HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> nicht detektierbar (Abb. 13). Innerhalb der Zellreihen verändert sich das Signal von p21 und p53 jedoch auch mit zunehmender HU Konzentration nicht maßgeblich.

Nachdem die im Western Blot nachgewiesenen Proteine erste Hinweise auf eine beginnende DNA-Schadensantwort lieferten und unterschiedlich stark ausgeprägte Signale der Checkpoint Proteine zwischen den Zelllinien detektiert wurden, wurden im nächsten Schritt die Auswirkungen von HU auf den Zellzyklus getestet. Hierfür wurden die Zellen für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an HU inkubiert und anschließend am Durchflusszytometer analysiert. Abbildung 14 zeigt, dass durch die Behandlung von HU nach 24h ein Anstieg der S-Phase in allen drei Zelllinien zu erkennen ist (0,5 mM HU: WT 23,5%; p53<sup>-/-</sup> 19,2%; p21<sup>-/-</sup> 22%). Bei einer Konzentration von 0,5 mM HU verdoppelte sich die S-Phase in allen drei Zellreihen, sinkt danach jedoch mit steigender Konzentration wieder ab (2 mM HU: WT 18%; p53<sup>-/-</sup> 14,9%; p21<sup>-/-</sup> 11,5%) (Abb. 14). Die G1 Population sinkt um etwa 10% bei einer



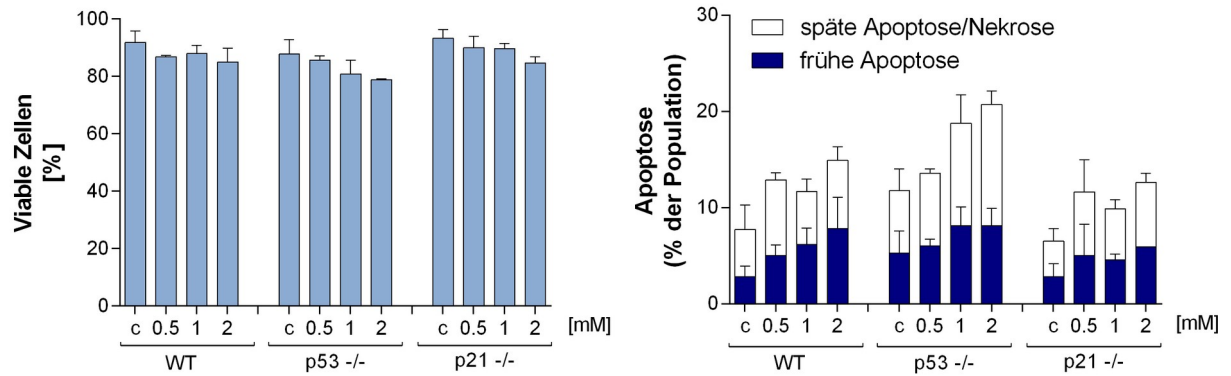
Konzentration von 0,5 mM HU in allen drei Zelllinien nach 24 h. Mit ansteigender HU Konzentration nimmt die G1-Phase wieder zu und erreicht in den HCT116<sup>WT</sup> und HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> wieder den Wert aus den unbehandelten Kontrollzellen (2 mM HU: WT 56,7%; p53<sup>-/-</sup> 52,4%). In der HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> übersteigt die G1-Phase nach Inkubation mit 2 mM HU den Ausgangswert der unbehandelten Kontrolle (48,6%) um weitere 6%. Die subG1-Fraktion veränderte sich innerhalb der Dosisreihe nur geringfügig (Abb. 14). Eine statistische Analyse der Zellzyklusdaten konnte keine Signifikanzen nachweisen.



**Abb. 14: Dosiswirkung von Hydroxyurea auf den Zellzyklus der HCT116 Zelllinien**

HCT116 Wildtyp, p53<sup>-/-</sup> und p21<sup>-/-</sup> Zellen wurden für 24 h Stunden mit steigenden HU Konzentrationen behandelt. Die Zellen wurden fixiert und mit PI gefärbt. Die Zellzyklusanalyse erfolgte am Durchflusszytometer. (n=3; MW + SD; two-way ANOVA, Bonferroni Korrektur).

Eine Analyse der Induktion von Apoptose mittels AnnexinV/PI nach 24 h Inkubation der Zellen mit HU, konnte ebenfalls keine statistisch signifikanten Ergebnisse innerhalb der frühen und späten Apoptosepopulation zeigen. Abbildung 14 zeigt jedoch die Tendenz, dass die HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Zelllinie am sensitivsten auf HU reagiert.

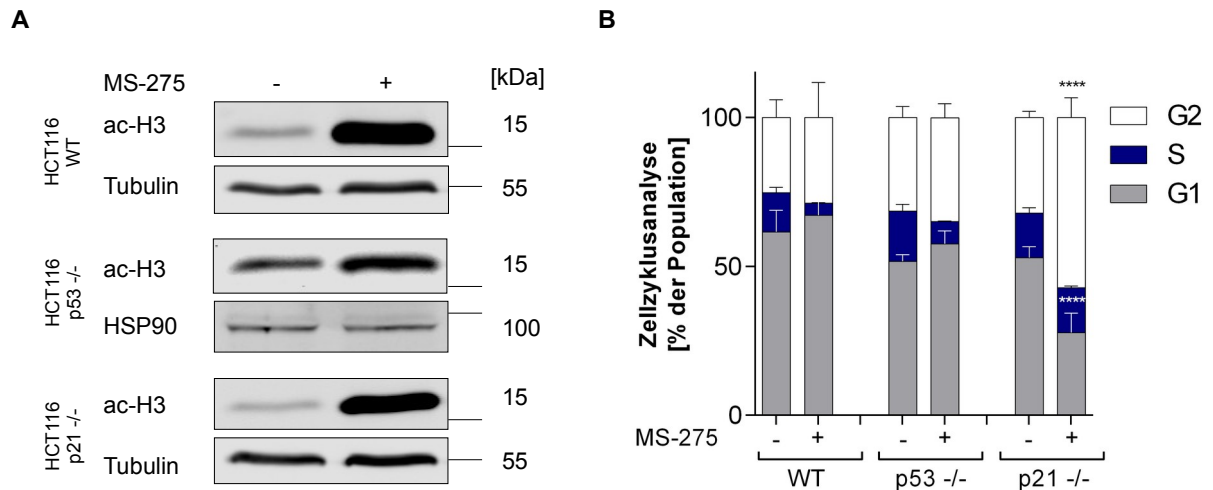


**Abb. 15: Zelltodmessung der mit Hydroxyurea behandelten HCT116 Zelllinien**  
HCT116 Zellen wurden mit steigender Dosis HU für 24 h inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit AnnexinV-FITC und PI und die Analyse am Durchflusszytometer. (n=2, MW + SD; two-way ANOVA; Bonferroni Korrektur).

### 4.3 Wirkung von MS-275

MS-275 (Entinostat) ist ein Histondeacetylase Inhibitor (HDACi), welcher sich zurzeit in der klinischen Testphase III zur antikanzerogenen Therapie befindet. MS-275 inhibiert HDACs der Klasse I HDAC 1-3 und ermöglicht somit die Transkription verschiedener Genabschnitte (siehe 2.5). HDACi spielen in der Monotherapie von soliden Tumoren eine untergeordnete Rolle, aber in der Kombinationstherapie mit Fluoropyrimidinen konnte gerade in Kolonkarzinomzellen vielversprechende präklinische Ergebnisse erzielt werden (Mohammad, Barbash, and Creasy 2019; Eckschlager et al. 2017; Fazzone et al. 2009).

Zur Überprüfung der Wirksamkeit von MS-275 wurde in einer Vorversuchsreihe mittels Western Blot das acetylierte Histon H3 (ac-H3), welches ein bekanntes Zielprotein von HDACs der Klasse I ist, nachgewiesen (Abb. 16A). Zusätzlich wurde eine Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt, um die Auswirkung der Hemmung der Klasse I HDACs auf die einzelnen Zellzyklusphasen zu verdeutlichen (Abb. 16B).



**Abb. 16: Effekte von MS-275 auf die Histonacetylierung und den Zellzyklus**

HCT116<sup>WT</sup>, HCT116<sup>p53 -/-</sup> und HCT116<sup>p21 -/-</sup> wurden mit 2  $\mu$ M MS-275 für 24 h inkubiert. (A) Gesamtzellextrakte wurden mittels Western Blot getestet. HSP90 und Tubulin dienen als Ladekontrollen. (n=2) (B) Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden 24 h mit MS-275 inkubiert, anschließend fixiert und mit PI gefärbt. (n=3; MW + SD; two-way ANOVA, Bonferroni Korrektur, \*\*\*\* p $\leq$ 0,0001).

Wie Abbildung 16A zeigt, ist in mit MS-275 inkubierten Zellen eine deutliche Zunahme des acetylierten Histon H3 (ac-H3) im Gegensatz zur unbehandelten Zellpopulation zu erkennen. Dieses Ergebnis kann in allen drei Zelllinien gleichermaßen gezeigt werden. In den HCT116<sup>p53 -/-</sup> Zellen ist im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien bereits in der unbehandelten Kontrolle ein stärkeres ac-H3 Signal detektierbar. Die in Abbildung 16B dargestellte Zellzyklusanalyse verdeutlicht die Zellzyklusphasenverschiebung nach MS-275 Behandlung. In den HCT116<sup>WT</sup> und HCT116<sup>p53 -/-</sup> Zellen kann ein geringfügiger G1 Phasenanstieg beobachtet werden (HCT116<sup>WT</sup> 67,1%, Vergleich contr.<sup>WT</sup> 61,5%; HCT116<sup>p53 -/-</sup> 57,5%, Vergleich contr.<sup>p53 -/-</sup> 51,6%), während in den HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zellen die G1-Phase um 25,1% sinkt. In den HCT116<sup>p21 -/-</sup> bleibt die S-Phase prozentual unverändert bei 15%. Im Vergleich dazu reduziert sich die S-Phase in den beiden anderen Zelllinien um über die Hälfte (HCT116<sup>WT</sup> von 13,2% auf 4,1% und HCT116<sup>p53 -/-</sup> von 16,9% auf 7,5%). Auch in der G2-Phase ist lediglich in den HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zellen ein signifikanter Anstieg um 25% zu beobachten (Abb. 16B).

Die Analyse dieser Daten konnte ein deutliches Ansprechen der Zellen auf den HDACi MS-275 auf molekularer Ebene zeigen (Abb. 16A). Jedoch ließ sich lediglich in HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zellen eine signifikante Auswirkung der Einzeltherapie mit MS-275 auf den Zellzyklus nachweisen. Aus diesem Grund, und da bereits in der Literatur

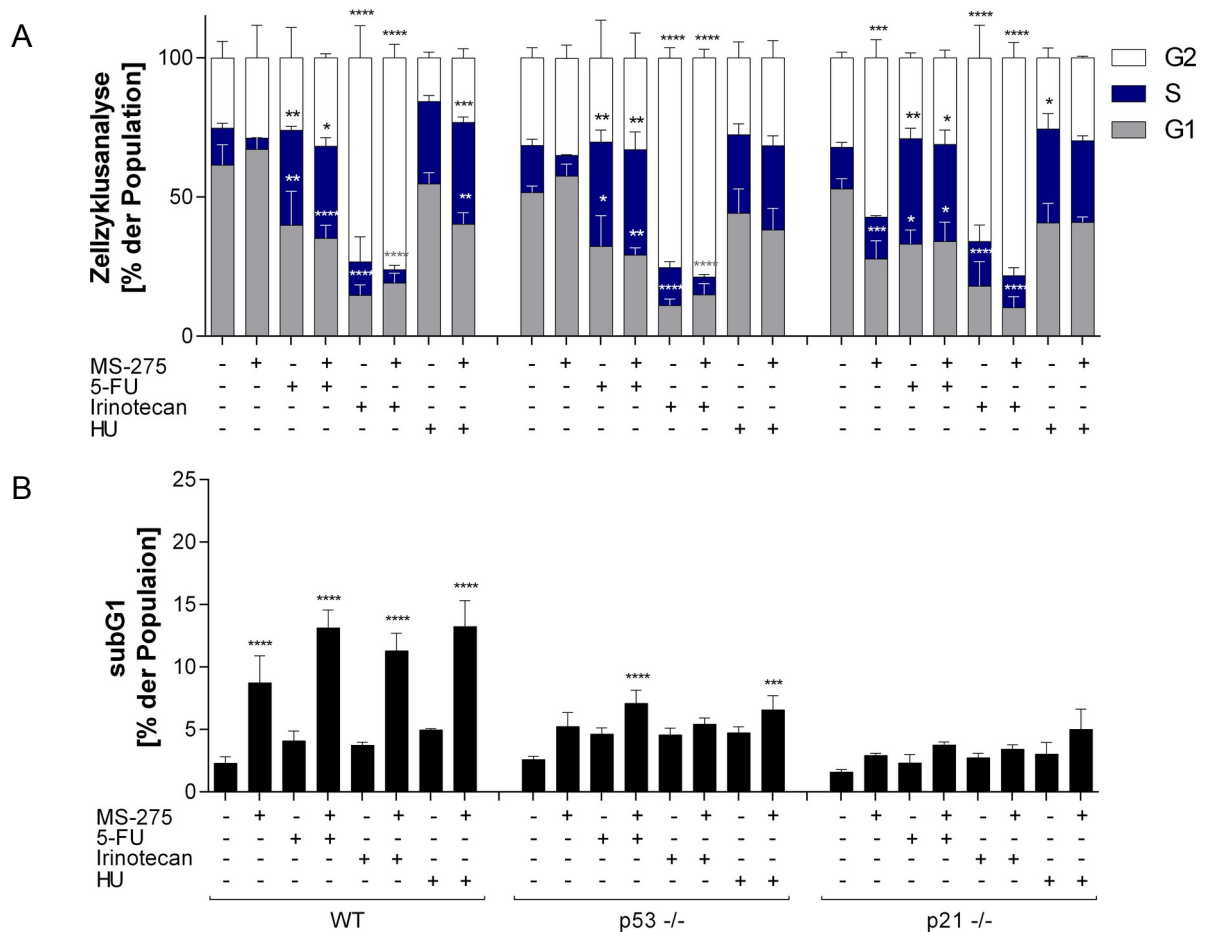
vielversprechende Effekte einer Kombinationstherapie mit Fluoropyrimidinen erzielt werden konnten, werden im nächsten Schritt die Auswirkung von MS-275 in Kombination mit 5-FU und weiteren Chemotherapeutika auf die verschiedenen HCT116 Zelllinien untersucht.

#### **4.4 Zellzyklusanalysen der HCT116 Zelllinien**

Anschließend an die Ergebnisse der Dosisreihen mit Irinotecan (siehe 4.2.1 ), 5-FU (siehe 4.2.2 ), Hydroxyurea (siehe 4.2.3 ) sowie der Einzeltherapie mit MS-275 (siehe 4.3 ) wurde im nächsten Schritt die Effekte einer Kombination dieser Wirkstoffe auf den Zellzyklus in allen drei Zelllinien untersucht. Hierfür wurden, bezogen auf die vorangegangenen Ergebnisse der Dosisreihen, eine Konzentration von 5  $\mu$ M für Irinotecan und 5- FU, 1 mM für Hydroxyurea sowie 2  $\mu$ M für MS-275 gewählt. Um eine adäquate Vergleichbarkeit zu gewähren wurden die drei Zelllinien pro Versuch mit demselben Medikamentenansatz in einem fixen Kombinationstherapieschema behandelt, gleichzeitig für 24 h inkubiert und direkt nacheinander mittels Durchflusszytometer analysiert.

Abbildung 17A zeigt ähnlich den Vorergebnissen aus den Dosisreihen einen signifikanten Abfall der G1-Phase und Anstieg der S-Phase in den mit 5  $\mu$ M 5-FU inkubierten HCT116<sup>WT</sup> Zellen im Vergleich zur Kontrolle. In Kombination mit 2  $\mu$ M MS-275 konnte eine zusätzliche Reduktion der G1-Phase um 4,7% dargestellt werden. Ähnlich verhält es sich mit den mittels 1 mM Hydroxyurea inkubierten Zellen. Auch hier konnte in HCT116<sup>WT</sup> Zellen durch die Kombination mit 2  $\mu$ M MS-275 eine Wirkverstärkung der bereits aus der Dosisreihe (siehe 4.2.3) bekannten Zellzyklusveränderungen dargestellt werden. Zusätzlich zum S-Phase Arrest zeigte sich ein signifikanter G1-Phase Verlust durch die Kombination mit MS-275 (von 61,5% in der Kontrolle auf 54,7% in HU inkubierten Zellen auf 40,3% in HU + MS-275 inkubierten Zellen). Durch die Therapie mit 5  $\mu$ M Irinotecan konnte ein signifikanter G2-Phase Arrest in HCT116<sup>WT</sup> Zellen detektiert werden (von 25,2% in der Kontrolle auf 73,3% in Irinotecan inkubierten Zellen). Auffällig an der Kombination von 5 $\mu$ M Irinotecan mit 2  $\mu$ M MS-275 ist die Reduktion der S-Phase mit einem signifikanten Anstieg der G1-Phase (S-Phase Reduktion um 7,3%; G1-Phase Anstieg um 4,4% im

Vergleich zur Irinotecan Einzelbehandlung). Wird die subG1-Fraktion (siehe Abb. 17B) der unterschiedlich therapierten Zellen betrachtet, sticht ein signifikanter Anstieg aller mit 2  $\mu$ M MS-275 therapierten HCT116<sup>WT</sup> Zellpopulationen ins Auge. Der Höchstwert findet sich mit 13,2% in der mit 1 mM HU + 2  $\mu$ M MS-275 inkubierten Zellpopulation.



**Abb. 17: Zellzyklusanalyse der mittels Kombinationstherapie inkubierten HCT116 Zelllinien nach 24 h**

HCT116<sup>WT</sup>, HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> und HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup>-Zellen wurden für 24 h Stunden mit 2  $\mu$ M MS-275, 5  $\mu$ M 5-FU, 5  $\mu$ M Irinotecan und 1 mM HU wie abgebildet inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und mit PI gefärbt. Die Zellzyklusanalyse erfolgte am Durchflusszytometer. **(A)** Die subG1-Fraktion wurde von der Gesamtpopulation subtrahiert und die verbleibende Population auf 100% gesetzt. (n=3; MW + SD; two-way ANOVA, Bonferroni Korrektur; \* p $\leq$ 0,05; \*\* p $\leq$ 0,01; \*\*\* p $\leq$ 0,001; \*\*\*\* p $\leq$ 0,0001) **(B)** Darstellung der subG1 Population (n=3; MW + SD; one-way ANOVA, Bonferroni Korrektur, \*\*\* p $\leq$ 0,001; \*\*\*\* p $\leq$ 0,0001).

Um die Bedeutung von p53 und p21 in den gewählten Kombinationstherapien zu untersuchen, wurden stabile HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> oder HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Zelllinien verwendet. Abbildung 17 zeigt des weiteren die durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse der

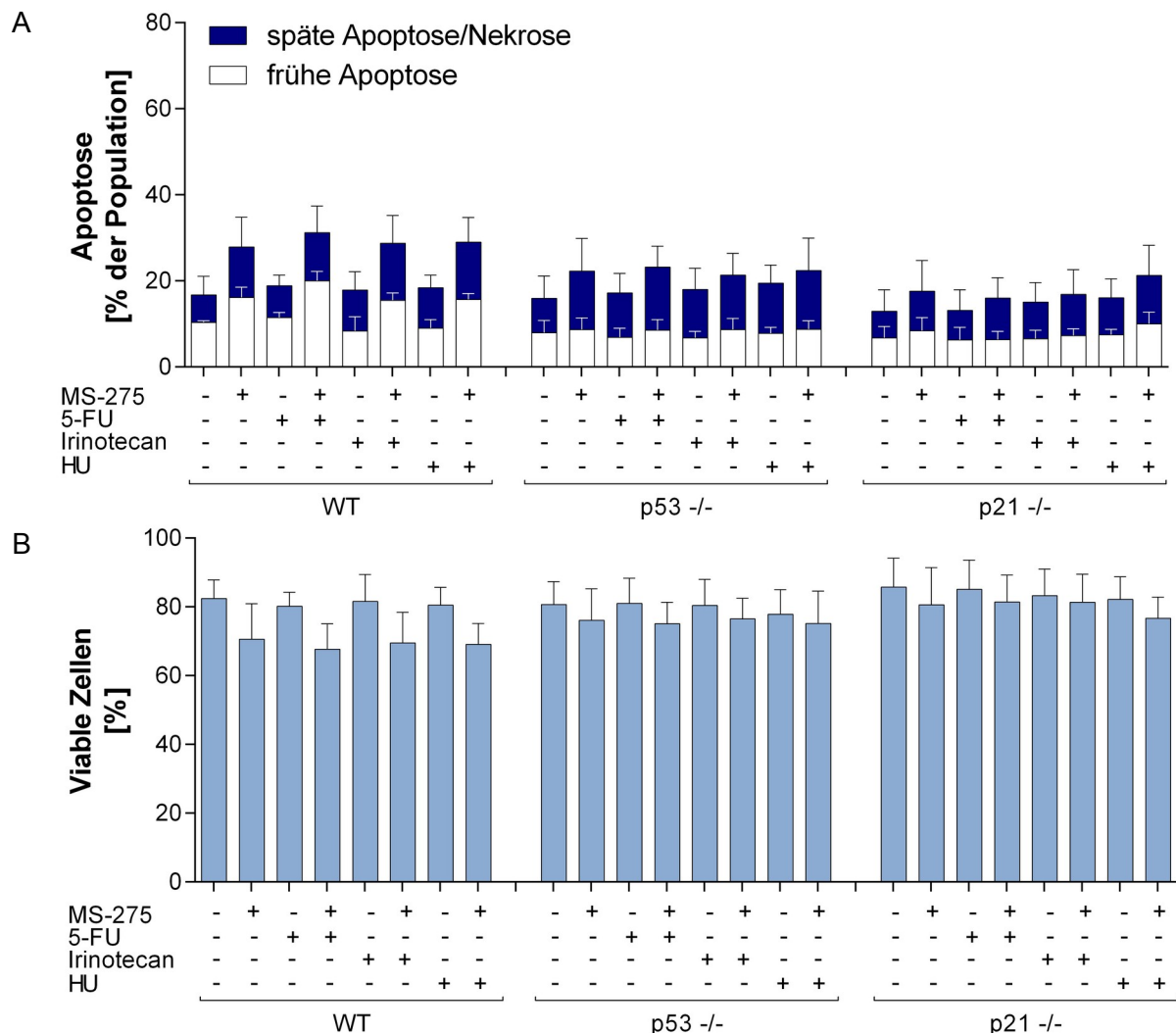
beiden knockout Zelllinien nach 24 h. Hierbei ist vor allem in der MS-275 Monotherapie eine deutliche Diskrepanz der G1-Phasen zwischen den beiden knockout Zelllinien erkennbar. In den HCT116<sup>p53 -/-</sup> Zellen zeigten sich nur schwache Unterschiede zu den parenteralen HCT116 Zellen. Im Gegensatz dazu sinkt der Anteil der HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zellpopulation in der G1-Phase signifikant um 25,1% im Vergleich zur Kontrolle. Durch die Therapie mit MS-275 werden die Zellen in der Progression des Zellzyklus behindert. In der Theorie erfolgt subsequent eine Abnahme der G1-Phase, während die Zellen über die Zeit in der G2-Phase arretieren. Hinweise darauf zeigt Abbildung 17A mit einem signifikanten Phasenanstieg der G2-Phase in den mit MS-275 behandelten HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zellen auf 57,2%. Dieser Trend lässt sich auch in den jeweiligen Kombinationstherapien innerhalb der HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zelllinien beobachten.

In beiden knockout Zelllinien ist eine signifikante Reduktion der G1-Phase sowohl in der Monotherapie mit 5 µM 5-FU als auch in der Kombinationstherapie mit 5 µM 5-FU und 2 µM MS-275 messbar. Zusätzlich kann in diesen Zellpopulationen ein Anstieg der S-Phase beobachtet werden, während keine signifikanten Änderungen der G2-Phase messbar sind. Ähnlich wie die Zellzyklusanalysen in den HCT116<sup>WT</sup> Zellen (siehe Abb. 17) zeigten sich auch in den beiden knockout Zelllinien ein signifikanter Anstieg der G2-Phase (siehe Abb. 17A). Der höchste prozentuale Anteil der G2-Phase konnte hierbei in der Kombinationstherapie mit 5 µM Irinotecan und 2 µM MS-275 in den HCT116<sup>p53 -/-</sup> Zellen mit 78,7% nachgewiesen werden. Gleichzeitig zeigte sich auch hier eine signifikante Reduktion der G1-Phase um 36,8% mit einem lediglich geringen Verlust der S-Phase. In den mit 1 mM HU behandelten Zellen wurde nach 24 h lediglich in der HCT116<sup>p21 -/-</sup> ein signifikanter Anstieg der S-Phase dargestellt (siehe Abb. 17A).

Wird Abbildung 17B betrachtet, so zeigt sich die Tendenz einer insgesamt höheren subG1-Fraktion in den HCT116<sup>p53 -/-</sup> Zellen gegenüber den HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zellen. Auffallend ist auch hier ein Anstieg der subG1-Fraktion in sämtlichen Zellpopulationen, welche mit MS-275 behandelt wurden, jedoch werden nicht in demselben prozentualen Ausmaß wie in den HCT116<sup>WT</sup> Zellen. Der höchste gemessene Anteil der subG1-Fraktion in der Zellpopulation beträgt 6,6% und konnte in den mit 1 mM HU und 2 µM MS-275 behandelten HCT116<sup>p53 -/-</sup> nachgewiesen werden. Innerhalb der HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zellen war ebenfalls in den mit 1 mM HU und 2

$\mu\text{M}$  MS-275 therapierten Zellen ein signifikanter Anstieg der subG1-Fraktion messbar.

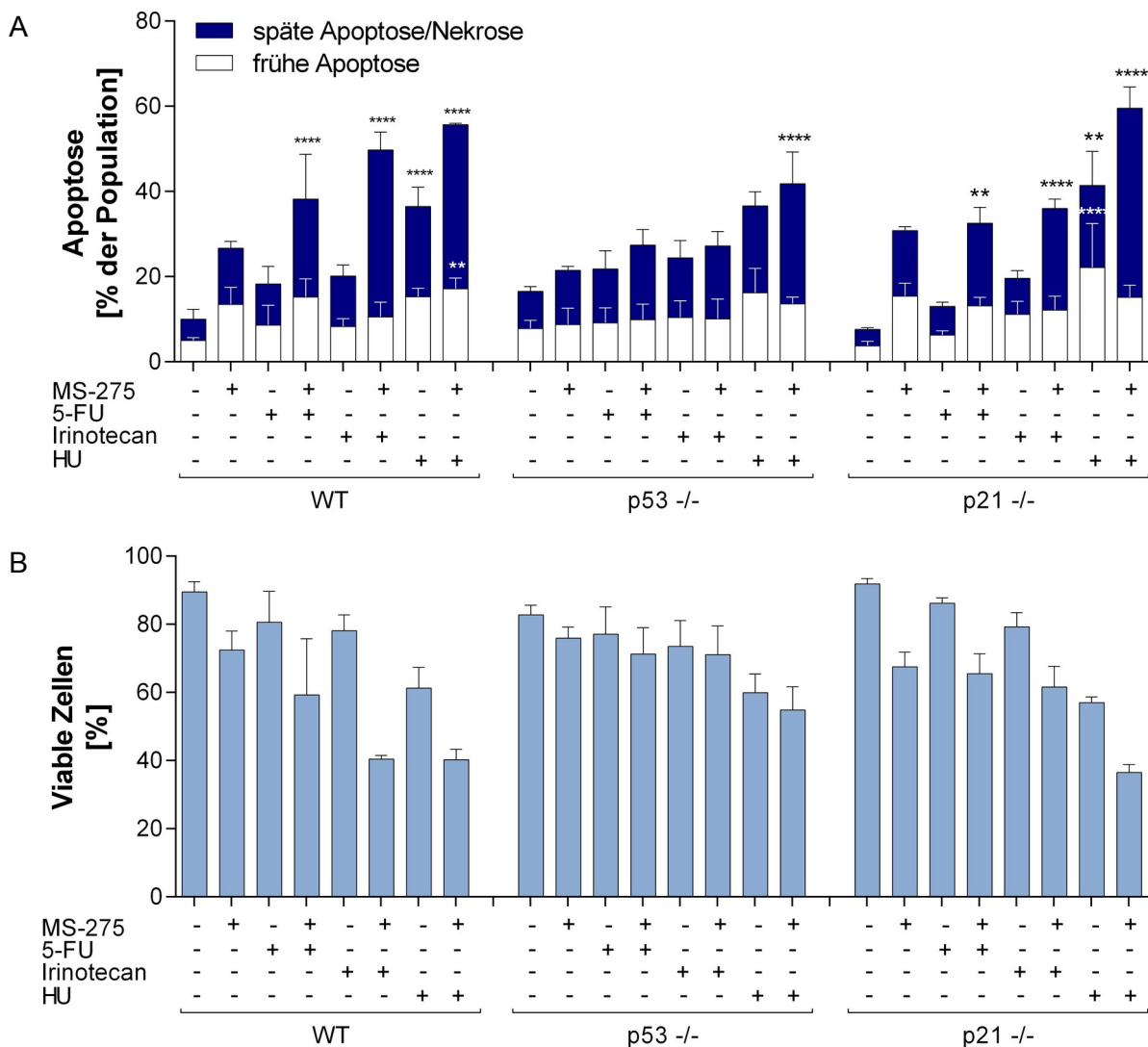
Zur genaueren Darstellung und Differenzierung erfolgte im Anschluss die Apoptosemessung mittels AnnexinV/PI Messverfahren. Hierbei zeigten sich in den HCT116<sup>WT</sup> Zellen nach 24 h nur gering erhöhte Apoptoseraten mit einem Maximum der Gesamtapoptose in der Kombination von 5-FU und MS-275 (31,3%) im Vergleich zur Kontrolle (16,7%). Hierbei zeigte sich vor allem ein Anstieg der frühen Apoptoserate um 9,7%, während in der späten Apoptose lediglich ein Anstieg um 4,8% im Vergleich zur Kontrolle messbar war (siehe Abb. 18A).



**Abb. 18: Zelltodanalyse der mittels Kombinationstherapie inkubierten Zellen nach 24 h**

HCT116<sup>WT</sup>, HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> und HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup>-Zellen wurden für 24 h Stunden mit 2  $\mu\text{M}$  MS-275, 5  $\mu\text{M}$  5-FU, 5  $\mu\text{M}$  Irinotecan und 1 mM HU wie abgebildet inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit AnnexinV-FITC und PI und die Analyse am Durchflusszytometer. **(A)** Statistische Auswertung der Zelltodmessung nach 24 h (n=3, MW + SD; two-way ANOVA; Bonferroni Korrektur). **(B)** Statistische Auswertung der viablen Zellen nach 24 h (n=3, MW + SD; two-way ANOVA; Bonferroni Korrektur).

Ähnlich zu den Ergebnissen der HCT116<sup>WT</sup> Zellen zeigten sich in den HCT116<sup>p53 -/-</sup> Zellen nach 24 h der höchste Anstieg der Gesamtapoptose in den mit 5-FU und MS-275 kombiniert behandelten Zellen (23,3%) im Vergleich zur Kontrolle (15,9%). In den HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zellen bewährte sich eher die Kombinationstherapie mit HU und MS-275 (Gesamtapoptose 21,3%; Vergleich zur Kontrolle: 12,9%). Insgesamt konnten nach 24 h jedoch in allen drei Zelllinien noch keine statistisch signifikanten Ergebnisse der frühen Apoptose sowie der späten Apoptose/Nekrose gemessen werden.



**Abb. 19: Zelltodanalyse der mittels Kombinationstherapie inkubierten Zellen nach 48 h**

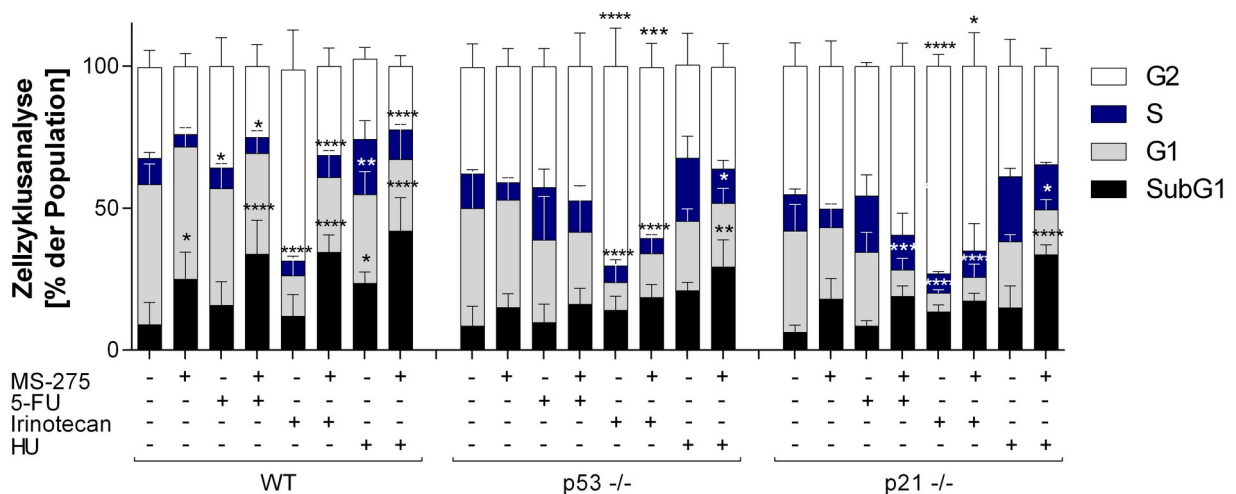
HCT116<sup>WT</sup>, HCT116<sup>p53 -/-</sup> und HCT116<sup>p21 -/-</sup>-Zellen wurden für 48 h Stunden mit 2  $\mu$ M MS-275, 5  $\mu$ M 5-FU, 5  $\mu$ M Irinotecan und 1 mM HU wie abgebildet inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit AnnexinV-FITC und PI und die Analyse am Durchflusszytometer. **(A)** Statistische Auswertung der Zelltodmessung nach 48 h (n=3, MW + SD; two-way ANOVA; Bonferroni Korrektur). **(B)** Statistische Auswertung der viablen Zellen nach 48 h (n=3, MW + SD; two-way ANOVA; Bonferroni Korrektur, \*\* p $\leq$ 0,01; \*\*\*\* p<0,0001).



Zur weiteren Untersuchung des Zelltodverhaltens in den HCT116 Zellen wurden daraufhin weitere AnnexinV/PI Analysen nach 48h durchgeführt. Die Ergebnisse hiervon zeigt Abbildung 19. Im Vergleich zu den Ergebnissen nach 24 h ist nach 48 h eine deutlich erhöhte Apoptoserate in den HCT116<sup>WT</sup> Zellen, welche eine Kombinationstherapie erhielten, zu detektieren. Insgesamt konnte in den mit 1 mM HU + 2 µM MS-275 die höchste signifikante Apoptoserate mit 17,2% früher Apoptose und 38,5% später Apoptose/Nekrose detektiert werden (Abb. 19A). In den mittels 5 µM Irinotecan + 2 µM MS-275 inkubierten HCT116<sup>WT</sup> Zellpopulationen zeigte sich vor allem ein Anstieg der späten Apoptose nach 48 h (frühe Apoptose: 10,5%, späte Apoptose/Nekrose: 39,2%). Dies entspricht einem um 34,2% erhöhtem Anteil der späten Apoptose/Nekrose im Vergleich zur Kontrolle (Vergleich nach 24 h: Anstieg um 6,9%), während in der frühen Apoptose im Vergleich zur Kontrolle lediglich ein Anstieg um 5,4% (Vergleich nach 24 h: Anstieg um 5,1%) festgestellt werden konnte (Abb. 19, 18). Während nach 24 h die höchste Apoptoserate in der Kombinationstherapie von 5 µM 5-FU + 2 µM MS-275 festgestellt werden konnte, ist der Anteil der apoptotischen Zellen nach 48 h bei dieser Kombinationstherapie im Vergleich zu den restlichen Kombinationstherapien in HCT116<sup>WT</sup> Zellen am geringsten. Der Prozentanteil der frühen Apoptose ist hierbei nahezu unverändert verglichen mit den Ergebnissen nach 24 h (nach 24 h: Zuwachs um 9,7%, nach 48 h: Zuwachs um 10,1%, jeweils auf die Kontrollen bezogen). In der späten Apoptose/Nekrose lässt sich ein signifikanter Anstieg um 18% bezogen auf die Kontrolle in HCT116<sup>WT</sup> Zellen darstellen.

Wie Abbildung 19 zudem verdeutlicht, sind die Unterschiede zwischen den HCT116 Zelllinien. Die HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zellen weisen ein ähnliches apoptotisches Muster wie die HCT116<sup>WT</sup> Zellen auf: Ein deutlicher Zuwachs der späten Apoptose/Nekrose sowie eine Reduktion der viablen Zellen ist in sämtlichen mit MS-275 behandelten HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zellen nachweisbar (Abb. 19). Dieses Verhalten konnte in HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Zellen deutlich weniger eindrücklich nachgewiesen werden. Stattdessen fiel eine höhere basale Apoptoserate in der HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Kontrollpopulation im Vergleich zu den nativen und p21 defizienten Kontrollzellen auf. Die HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zellen weisen des weiteren eine geringere Apoptoserate in den mit 5-FU und Irinotecan einzelbehandelten Zellen im Vergleich zu den HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Zellen auf. Den höchsten Anteil der späten Apoptose/Nekrose mit 44,4% konnte in den mit 1 mM HU und 2 µM

MS-275 behandelten HCT116<sup>p21</sup><sup>-/-</sup> Zellen detektiert werden. Zudem zeigte sich in den HCT116<sup>p21</sup><sup>-/-</sup> Zellen bei einer Monotherapie mit 1 mM HU der höchste signifikante Anstieg der frühen Apoptose mit 22,2% im Vergleich zur Kombinationstherapie mit 15,1%. Auch in den HCT116<sup>p53</sup><sup>-/-</sup> Zellen konnte die stärkste Induktion von Apoptose in den mit HU behandelten Zellpopulationen gemessen werden (frühe Apoptose: 13,6%; späte Apoptose/Nekrose: 28,2%). Wird die Apoptoserate in HCT116<sup>p53</sup><sup>-/-</sup> Zellen im Gesamten betrachtet, zeigte sich kaum ein Zuwachs an apoptotischen Zellen durch die Kombination von MS-275 mit 5-FU oder Irinotecan. Generell konnte kein signifikanter Anstieg der Apoptose im Vergleich zur Kontrolle in sämtlichen behandelten Zellpopulation der HCT116<sup>p53</sup><sup>-/-</sup> Zellen, ausgenommen der Kombinationstherapie mit HU und MS-275, dargestellt werden (Abb. 19). Dies ist ein möglicher Hinweis auf Resistenzmechanismen in p53 defizienten HCT116 Zellen.

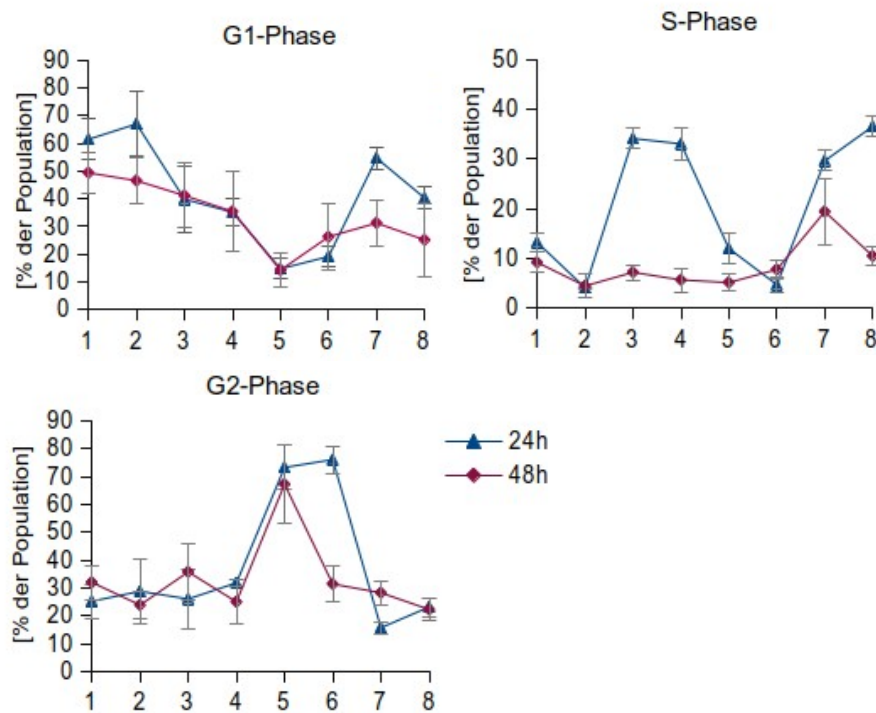


**Abb. 20: Zellzyklusanalyse der mittels Kombinationstherapie inkubierten HCT116<sup>WT</sup> Zellen nach 48 h**

HCT116<sup>WT</sup>, HCT116<sup>p53</sup><sup>-/-</sup> und HCT116<sup>p21</sup><sup>-/-</sup> Zellen wurden für 48 h Stunden mit 2 µM MS-275, 5 µM 5-FU, 5 µM Irinotecan und 1 mM HU wie abgebildet inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und mit PI gefärbt. Die Zellzyklus-analyse erfolgte am Durchflusszytometer (n=5; MW + SD; two-way ANOVA, Bonferroni Korrektur; \* p≤0,05; \*\* p≤0,01; \*\*\*\* p≤0,0001).

Auf Grund der erhöhten Apoptosewerte nach 48 h wurde nochmals eine durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse durchgeführt. Von besonderem Interesse war hierbei einen möglichen *Shift* einzelner Zellzyklusphasen in die subG1-Fraktion darzustellen. Hierfür wurden die verschiedenen Behandlungen der Zellen sowohl mit der Kontrolle nach 48 h (Abb. 20) als auch mit den Therapieergebnissen nach 24 h (Abb. 17) verglichen. Wie Abbildung 20 verdeutlicht, ist der Anstieg der subG1-Fraktion innerhalb der HCT116<sup>WT</sup> Zelllinie nach 48 h in den Zellpopulationen, welche mit 1 mM HU + 2 µM MS-275 (subG1 42%) und 5 µM Irinotecan + 2 µM MS-275

(subG1 34.5%) behandelt wurden im Vergleich zur Kontrolle (subG1 8.9%) besonders auffallend. Wird die Zellzyklusanalyse genauer betrachtet, zeigt sich in beiden Kombinationstherapien ebenfalls ein deutlicher Abfall der G1-Phase verglichen mit der Kontrolle (Von 49,4% in der Kontrolle auf 26,3% in Irinotecan + MS-275 inkubierten Zellen und 25,2% in HU + MS-275 inkubierten Zellen) (Abb. 20). Während die G1-Phase in HCT116<sup>WT</sup> Zellen nach 24 h und 48 h in den mit Irinotecan und MS-275 behandelten Zellen annähernd konstant bleibt, sinkt die G1-Phase in den mit Hydroxyurea und MS-275 behandelten Zellen nach 48 h nochmals um 15,1% auf 25,2%. In der S-Phase zeigte sich ein ähnliches Phänomen. Eine deutliche Reduktion der G2-Phase in HCT116<sup>WT</sup> Zellen nach 48 h (31,4%) verglichen mit den Werten nach 24 h (76,1%) zeigte sich in der Kombination aus 5 µM Irinotecan mit 2 µM MS-275 (Abb. 22). Während nach 24 h eine Verdreifachung der G2-Phase im Bezug auf die Kontrolle detektierbar ist (von 25,2% in der Kontrolle auf 76,1%) (Abb. 17) und somit ein eindeutiger G2-Phase Arrest stattfindet, entspricht die G2-Phase nach 48 h wieder in etwa der G2-Phase der Kontrolle (Kontrolle: 32%; 5 µM Irinotecan + 2 µM MS-275: 31,4%) (Abb. 20). Dieser Verlust der G2-Phase nach 48 h ist am ehesten durch eine Verschiebung in die subG1-Fraktion mit entsprechender Apoptose, wie die Daten der AnnexinV/PI Zelltodmessung in Abbildung 19 zeigen, erklärbar. Zur besseren Veranschaulichung der Unterschiede im Zellzyklus der HCT116<sup>WT</sup> Zellen nach 24 h und 48 h wurden die Mittelwerte der einzelnen Zellzyklusphasen im unten stehenden Graphen gegenübergestellt (Abb. 21).



**Abb. 21: Prozentualer Vergleich der Zellzyklusphasen in HCT116<sup>WT</sup> Zellen nach 24 h und 48 h**

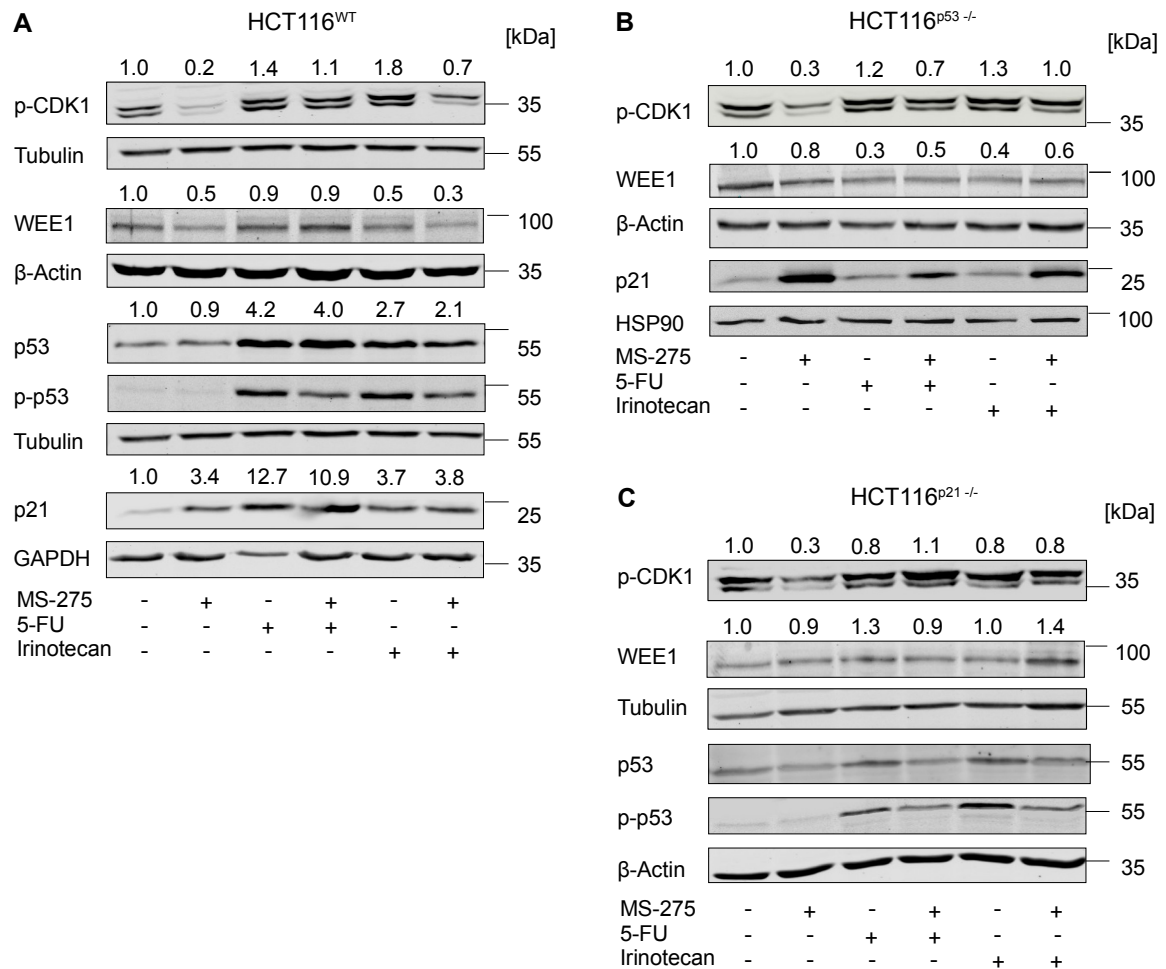
HCT116<sup>WT</sup> Zellen wurden für 24 h und 48 h Stunden mit 2 μM MS-275, 5 μM 5-FU, 5 μM Irinotecan und 1 mM HU inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und mit PI gefärbt. Die Zellzyklusanalyse erfolgte am Durchflusszytometer. Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde graphisch gegenübergestellt. (Werte nach 24 h n=3, Werte nach 48 h n=5; MW + SD; Legende für die X-Achse: 1 = contr., 2 = 2 μM MS-275, 3 = 5 μM 5-FU, 4 = 5 μM 5-FU + 2 μM MS-275, 5 = 5 μM Irinotecan, 6 = 5 μM Irinotecan + 2 μM MS-275, 7: 1 mM HU, 8: 1 mM HU + 2 μM MS-275).

Abbildung 20 zeigte zudem die Veränderungen im Zellzyklus der beiden HCT116 knockout Zelllinien nach 48 h. Sowohl in den HCT116<sup>p53 -/-</sup> als auch in den HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zellen ist in den mit 5-FU einzeln behandelten Zellen ein deutlicher S-Phase Verlust nach 48 h (HCT116<sup>p53 -/-</sup> 18,5%; HCT116<sup>p21 -/-</sup> 21,3%) im Vergleich zu den Ergebnissen nach 24 h (HCT116<sup>p53 -/-</sup> 37,5%; HCT116<sup>p21 -/-</sup> 37,9%) zu erkennen. Durch die Kombination mit MS-275 wurde die S-Phase weiter reduziert (HCT116<sup>p53 -/-</sup> 11%; HCT116<sup>p21 -/-</sup> 13,8%), sodass diese nach 48 h wieder annähernd den Werten der S-Phase aus den jeweiligen Kontrollzellen entsprachen (HCT116<sup>p53 -/-</sup> contr. 12,3%; HCT116<sup>p21 -/-</sup> contr. 13,3%). Im Gegensatz dazu konnte eine deutliche Reduktion der G1-Phase (von 41,3% in der HCT116<sup>p53 -/-</sup> contr. auf 25,4% und von 38,4% in der HCT116<sup>p21 -/-</sup> contr. auf 9,9%) in den mit 5-FU und MS-275 kombiniert behandelten Zellen detektiert werden (Abb. 20). Im Vergleich zu den HCT116<sup>WT</sup> Zellen zeigten beide knockout Zelllinien deutlich veränderte G1-Phasen (HCT116<sup>WT</sup>: 35,4%; HCT116<sup>p53 -/-</sup>: 25,4%; HCT116<sup>p21 -/-</sup> 9,9%) in den mit 5-FU und MS-275 kombiniert

behandelten Zellen. Interessanterweise konnte im Vergleich zu den Ergebnissen der HCT116<sup>WT</sup> Zellen eine Persistenz des signifikanten G2-Phase Arrests (HCT116<sup>p53 -/-</sup> 60,2%; HCT116<sup>p21 -/-</sup> 62,8%) auch nach 48 h durch die Kombinationsbehandlung von Irinotecan mit MS-275 in den HCT116 knockout Zelllinien beobachtet werden. Gleichzeitig zeigte sich eine signifikant erniedrigte G1-Phase (HCT116<sup>p53 -/-</sup> 15,5%; HCT116<sup>p21 -/-</sup> 9,7%) und ein Anstieg der subG1-Fraktion (von 8,5% in der HCT116<sup>p53 -/-</sup> contr. auf 18,5% und von 5,5% in der HCT116<sup>p21 -/-</sup> contr. auf 17,1%). Der stärkste signifikante Anstieg der subG1-Fraktion konnte jedoch durch die Kombinationsbehandlung von 1 mM HU mit 2 µM MS-275 in den HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zellen (33,8%) detektiert werden. In den HCT116<sup>p53 -/-</sup> stieg die subG1-Fraktion durch die gleiche Behandlung um 20,7% auf insgesamt 29,2% an (Abb. 20).

#### **4.5 Molekularbiologische Prozesse der Zellzykluskontrolle in HCT116 Zellen**

Aus den Zellzyklusanalysen (Abb. 17, 20) geht hervor, dass Kombinationsbehandlungen von Irinotecan, HU und 5-FU mit MS-275 zu starken Veränderungen der einzelnen Phasen des Zellzyklus führen. Im nächsten Schritt wurden die molekularbiologischen Prozesse der Zellzykluskontrolle untersucht. Hierfür wurden in Abbildung 22 mittels Western Blot die Proteine WEE1 und die Phosphorylierung von CDK1 nach 24 h Behandlung dargestellt. Diese beiden Proteine spielen eine maßgebliche Rolle in der Regulierung des G2/M-*Checkpoints*.



**Abb. 22: Expression der Zellzyklus Checkpoint Proteine nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Chemotherapieansätzen**

HCT116<sup>WT</sup> (A), HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> (B), und HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> (C) Zellen wurden für 24 h mit 2 µM MS-275, 5 µM 5-FU, 5 µM Irinotecan und 1 mM HU wie abgebildet inkubiert. Gesamtzellextrakte wurden mittels Western Blot getestet. Tubulin, β-Actin und GAPDH dienen als jeweilige Ladekontrolle. Die gezeigten Blots sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängig durchgeführte Experimente. Quantifizierung von WEE1, pCDK1, p21 und p53 mittels Densitometrie. Die erhaltenen Werte wurden auf die jeweilige Ladekontrolle normalisiert.

Abbildung 22A zeigt in den HCT116<sup>WT</sup> Zellen, welche mit MS-275 behandelt wurden, bereits nach 24 h eine deutliche Reduzierung der Phosphorylierung von CDK1. Entsprechend hierzu nimmt auch das WEE1 Signal in mit MS-275 einzelbehandelten Zellen ab. In der Densitometrie konnte eine Reduktion um die Hälfte gemessen werden (von 1,0 *fold induction* in der Kontrolle auf 0,5 *fold induction* nach der Behandlung mit MS-275). Die Einzelbehandlung mit Irinotecan zeigte im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls eine Reduktion von WEE1 um die Hälfte. Durch die Kombination mit MS-275 sank das gemessene WEE1 Signal auf 0,3 in der Densitometrie ab. Während diese Kombinationstherapie auch die Phosphorylierung

von CDK1 deutlich reduzierte (0,7), zeigte die Einzelbehandlung mit Irinotecan einen gegenteiligen Effekt. Es konnte im Vergleich zur Kontrollpopulation eine verstärkte Phosphorylierung von CDK1 (1,8) detektiert werden (Abb. 22A). Dies ist kongruent zu den Daten aus der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse, welche vor allem durch diese Kombinationstherapie in HCT116<sup>WT</sup> Zellen einen G2-Phase Arrest zeigte (Abb. 17). Des Weiteren zeigt Abbildung 22A eine deutlich verstärkte Phosphorylierung von CDK1 in beiden mit Hydroxyurea behandelten Proben. Durch die Kombination mit MS-275 nimmt die Phosphorylierung im Vergleich zur HU Einzelbehandlung (2,4) nochmals geringfügig zu (2,6). Im Gegensatz dazu zeigte die densitometrische Messung von WEE1 eine Abnahme der Signalintensität in der Kombinationstherapie (0,8) im Vergleich zur Kontrolle (1,0). Die Behandlung der HCT116<sup>WT</sup> mit 5-FU, einzeln und in Kombination mit MS-275, zeigten beide eine geringfügige Reduktion von WEE1 auf 0,9 in der Densitometrie (Abb. 22A). CDK1 wurde durch 5-FU vermehrt phosphoryliert. Densitometrisch zeigte sich ein Anstieg auf 1,4. Durch die Kombination mit MS-275 verringerte sich die Phosphorylierung von CDK1 auf 1,1 in der Densitometrie (Abb. 22A).

Aus der Literatur ist bekannt, dass neben den CDKs und WEE1 weitere Proteine an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind. Es gibt Hinweise, dass eine Behandlung mit MS-275 die Proteinexpression von den beiden Tumorsuppressoren p53 und p21 (Di Bernardo et al. 2010; Mariadason 2008) und PR130 (Göder 2019) beeinflusst. Aus diesem Grund wurden mittels Immunoblot Veränderungen der genannten Proteine nach verschiedenen Kombinationsschemata untersucht. Das Protein p53 kann durch unterschiedliche Methoden posttranslational modifiziert werden, welche unterschiedliche Auswirkungen auf die Zellfunktionen ausüben. In diesem Fall wurde die Phosphorylierung an Ser15 dargestellt, welche essentiell für die Stabilisierung und Funktionalität von p53 ist (Loughery et al. 2014b) und unter anderem gemeinsam mit p21 Einfluss auf den G1/S-Phase Checkpoint ausüben (siehe 2.3 ). In der Kontrolle sowie in den mit MS-275 behandelten Zellen konnten nur basale Level an p53 und seiner phosphorylierten Form detektiert werden. Die stärkste Induktion von p53 bewirkte in HCT116<sup>WT</sup> Zellen die Monotherapie mit 5-FU (Abb. 22A). Eine Behandlung der Zellen mit 1 mM HU für 24 h führte zu einer deutlichen Phosphorylierung von p53 an Ser15 (Abb. 22A). In beiden Fällen konnte jedoch eine Abnahme der Phosphorylierung von p53 nach einer zusätzlichen Behandlung mit

MS-275 detektiert werden. Werden die Western Blot Banden des CKI p21 betrachtet, zeigte sich in beiden mit HU behandelten Proben keine Veränderungen der p21 Level im Vergleich zur Kontrolle. Der stärkste Effekt wird deutlich in den mit 5-FU behandelten Proben gezeigt. In der Densitometrie zeigte sich in HCT116<sup>WT</sup> Zellen eine 12,7-fache Induktion durch die Einzelbehandlung mit 5-FU und eine 10-fache Induktion der kombiniert behandelten Zellen (Abb. 22A). Konsistent zu den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen einer p53-unabhängigen p21 Induktion, konnte bei basalem p53 eine eindeutig erhöhte Konzentration von p21 in den mit MS-275 einzelbehandelten Zellen detektiert werden. Entgegen den Erwartungen zeigte sich jedoch eine Abnahme der Signalstärke von p21 in der Kombinationstherapie mit MS-275 im Vergleich zur 5-FU und HU Einzelbehandlung in HCT116<sup>WT</sup> Zellen. Lediglich die Kombinationstherapie von Irinotecan mit MS-275 zeigte ein geringfügig erhöhtes Vorkommen an p21 im Vergleich zur Einzelbehandlung (Abb. 22A). Um die Rolle von p53 und p21 in der Schadensantwort auf die Kombinationsschemata in HCT116 Zellen genauer zu untersuchen, wurden diese Experimente nachfolgend in p53 defizienten und p21 defizienten Zellen wiederholt.

In den Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass sowohl in den HCT116<sup>p53</sup><sup>-/-</sup> (Abb. 22B) als auch in den HCT116<sup>p21</sup><sup>-/-</sup> (Abb. 22C) Zellen eine deutliche Abnahme der Phosphorylierung von CDK1 in den einzeln mit 2 µM MS-275 inkubierten Zellen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle detektiert werden konnte. Eine Reduktion der Aktivität von CDK1 nach MS-275 Behandlung ist in abgeschwächter Form ebenfalls in den jeweiligen Kombinationstherapien der HCT116<sup>p53</sup><sup>-/-</sup> Zellen nachweisbar. Diese Beobachtung der verringerten Phosphorylierung von CDK1 nach Kombination mit MS-275 konnte in den HCT116<sup>p21</sup><sup>-/-</sup> Zellen jedoch nicht mehr eindeutig gezeigt werden. Hier blieb die Signalstärke in den unterschiedlich behandelten Zellen annähernd gleich (Abb. 22C). Das Protein WEE1 zeigte in den HCT116<sup>p21</sup><sup>-/-</sup> eine geringe Reduktion der densitometrisch gemessenen Signalstärke nach der Einzelbehandlung mit MS-275 (0,9) im Vergleich zur Kontrolle. Während durch eine Einzelbehandlung mit 5-FU (1,3) und HU (1,2) erhöhtes WEE1 detektierbar war, wurde WEE1 durch die Kombination mit MS-275 wiederum auf 0,9 in den Zellen mit 5-FU und auf 0,8 in den Zellen mit zusätzlicher HU Behandlung reduziert. Lediglich eine Kombination von MS-275 mit Irinotecan (1,4) zeigte im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Irinotecan (1,0) und auch zur Kontrolle ein erhöhtes Vorliegen

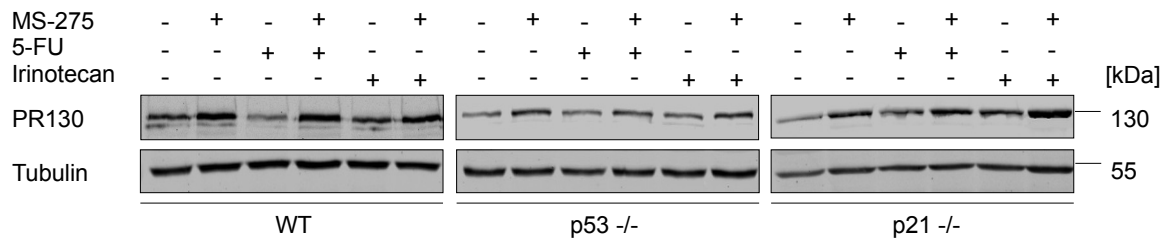


von WEE1. Des Weiteren zeigt Abbildung 22C ein basales Level an p53 in HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zellen. Wie in Kapitel 2.4 beschrieben induziert die DNA Schadensantwort eine Phosphorylierung von p53 an Ser15. In den HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zellen konnte in der Behandlung mit 5 µM Irinotecan die stärkste Phosphorylierung von p53 nachgewiesen werden.

In der HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Zelllinie zeigte sich nach der Behandlung mit Chemotherapeutika, einzeln und in Kombination, ubiquitär eine Reduktion von WEE1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 22B). Während die Kombination von HU mit MS-275 (0,5) wie in den HCT116<sup>WT</sup> Zellen ebenfalls zu einer Reduktion von WEE1 im Vergleich zur Einzelbehandlung mit HU (0,6) und zur Kontrolle (1,0) führt, zeigten die anderen beiden Kombinationstherapien jeweils einen Anstieg an WEE1 im Vergleich zur jeweiligen Einzelbehandlung (Abb. 22B). Entsprechend des Prinzips eines *TP53* knockouts konnte in den HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Zellen weder p53 noch p-p53 auf Proteinebene via Western Blot detektiert werden. Konsistent zur Literatur konnte eine eindeutige p21 Zunahme in den mit MS-275 einzeln und kombiniert therapierten Zellpopulationen nachgewiesen werden (Abb. 22B). Diese Ergebnisse unterstützen die in der Literatur beschriebene p53-unabhängige Signalinduktion von p21 durch den HDACi MS-275.

## 4.6 Auswirkungen von PR130 auf den Zellzyklus

Wie in Kapitel 2.6 beschrieben, ist eine regulatorische Untereinheit, der Protein Phosphatase 2A (PP2A), PR130 in den RS-induzierten intrazellulären Mechanismen der DNA-Schadensantwort und Apoptose beteiligt. Im ersten Schritt wurde vorerst das intrazelluläre Vorkommen des Proteins PR130 in den HCT116<sup>WT</sup>, HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup>, HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zellen via Western Blot untersucht. Von besonderem Interesse waren hierbei Veränderungen der intrazellulären Proteinexpression nach Induktion von replikativen Stress durch verschiedene Chemotherapeutika - einzeln und in Kombination mit dem HDACi MS-275. Da die Effekte von Hydroxyurea bereits ausführlich durch Göder (2019), eine ehemalige Doktorandin in der Arbeitsgruppe Krämer, beschrieben wurden, wurde in den folgenden Versuchen auf die Therapie mit Hydroxyurea in HCT116 Zellen verzichtet.



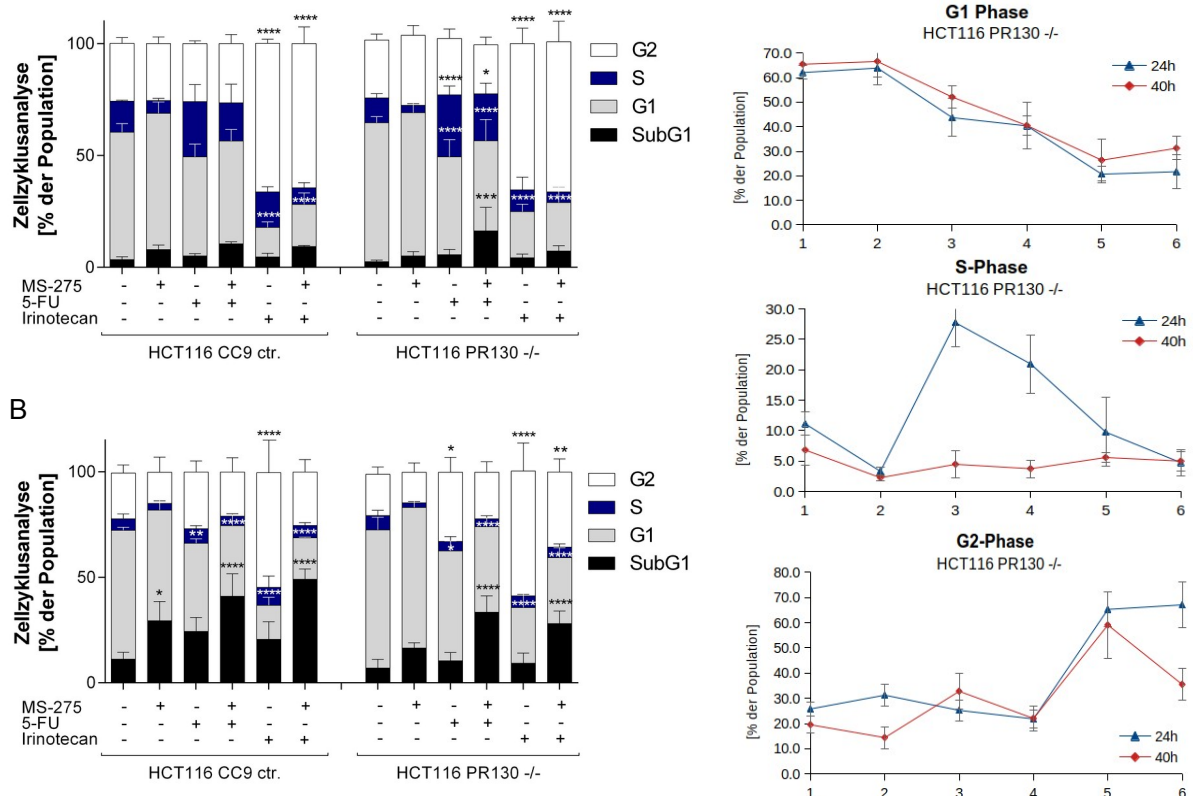
**Abb. 23: Reaktion von PR130 auf die Induktion von replikativen Stress in HCT116 Zelllinien**

Die HCT116<sup>WT</sup>, HCT116<sup>p53 -/-</sup> und HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zellen wurden für 24 h mit 2 µM MS-275, 5 µM 5-FU und 5 µM Irinotecan wie abgebildet inkubiert. Gesamtzellextrakte wurden mittels Western Blot jeweils auf das Protein PR130 getestet. Tubulin dient als Ladekontrolle. Die gezeigten Blots sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängig durchgeführte Experimente.

In Abbildung 23 wird die Signalverstärkung von PR130 nach Exposition mit MS-275 einzeln und in Kombination vor allem in den HCT116<sup>WT</sup> und HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zellen verdeutlicht. Auffällig ist zudem ein höheres basales Level von PR130 in den HCT116<sup>WT</sup> Kontrollzellen im Vergleich zu den beiden knockout Zelllinien. Nachdem eine eindeutige Modulation von PR130 auf MS-275 induzierten replikativen Stress festgestellt werden konnte, wurden im nächsten Schritt Effekte eines PR130 knockouts untersucht. Hierfür wurde das Gen *PPP2R3A*, welches PR130 kodiert, mittels CRISPR/Cas9 herausgeschnitten. Kurz gefasst, ist CRISPR/Cas9 (CC9) eine Technologie zur Genmodifikation. Anhand einer sogenannten *guide RNA* wird die Zielstruktur im Genom ausfindig gemacht und anschließend wird mittels der Cas9 Endonuklease ein Doppelstrangbruch induziert. Hiernach treten die zelleigenen Reparatur-mechanismen in Aktion (Kap. 2.4 ). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Klone von HCT116 Zellen, die mittels CC9 im Gen *PPP2R3A* modifiziert wurden und kein PR130 mehr tragen, untersucht (#3 und #16, welche in dieser Arbeit fortan als HCT116<sup>PR130 -/-</sup> bezeichnet werden), sowie eine Kontrollzelllinie (HCT116<sup>CC9 ctr.</sup>) mit intakter PR130 Expression verwendet.

Um die Rolle von PR130 im Zellzyklus und die Induktion von Apoptose zu untersuchen, wurden HCT116<sup>CC9 ctr.</sup> und HCT116<sup>PR130 -/-</sup> Zellen mit dem gleichen Kombinationsschema wie in Tabelle 3 (mit Ausnahme von HU) stimuliert. In Abbildung 24 werden die Auswirkungen der Kombinationstherapie auf PR130 tragende Zellen und Zellen mit fehlendem PR130 dargestellt. Nach 24 h zeigten sich in den HCT116<sup>CC9 ctr.</sup> Zellen ähnliche Ergebnisse wie in den HCT116<sup>WT</sup> Zellen (Kap. 4.4 ). Die Zellzyklusphasenverteilung der HCT116<sup>PR130 -/-</sup> Zellpopulation entsprach weitestgehend den PR130 tragenden Zellen. Jedoch zeigte sich in HCT116<sup>PR130 -/-</sup>

bereits nach 24 h in den mit 5-FU behandelten Zellen ein signifikanter S-Phase Arrest (S-Phase 27,7%) mit einem G1-Phasenverlust von 62,1% in der unbehandelten Kontrolle auf 43,7% nach 5-FU Behandlung. In Kombination mit MS-275 zeigte sich ein geringerer Anstieg der S-Phase (21%) und ein erhöhter G1-Phasenverlust (40,3%). Wird die subG1-Fraktion in Abbildung 24A betrachtet, ist der Phasenverlust von G1 möglicherweise durch eine signifikanten Zunahme der subG1-Fraktion (16,2%, Vergleich Kontrolle: 2,6%) erklärbar.



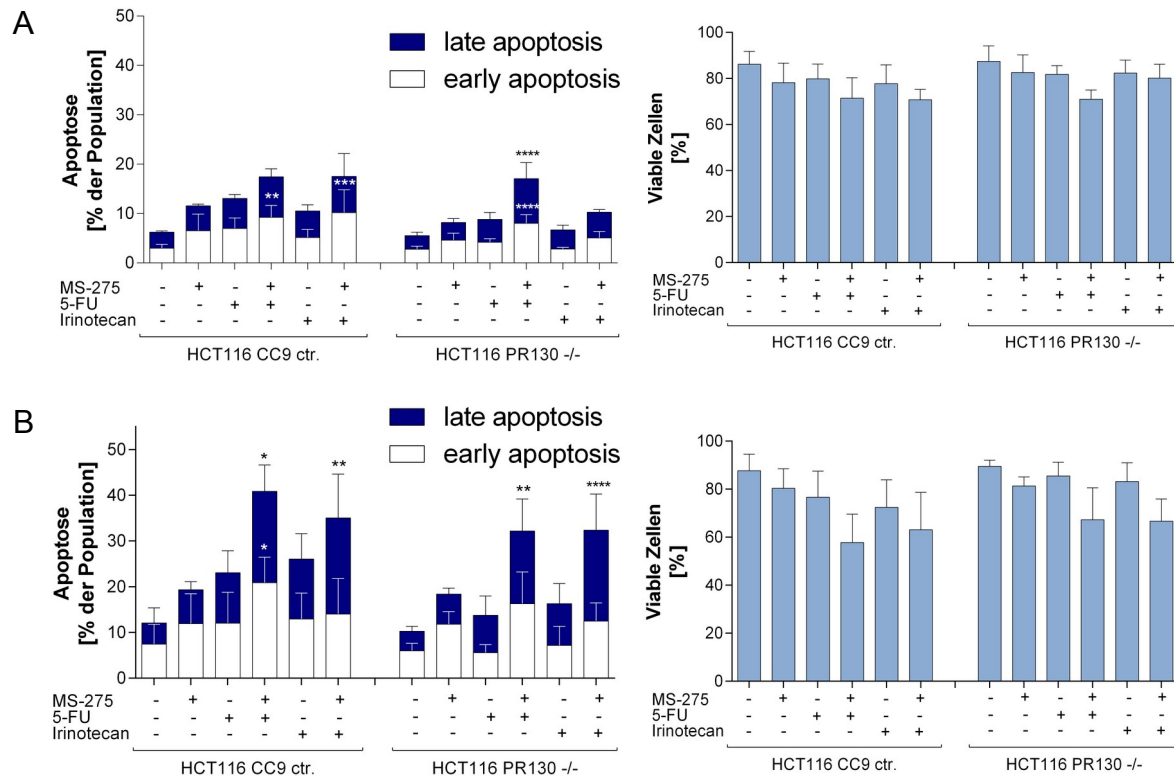
**Abb. 24: Einfluss von PR130 auf den Zellzyklus nach Kombinationstherapie**

(A) HCT116<sup>CC9 ctr.</sup> Zellen und HCT116<sup>PR130 -/-</sup> Zellen wurden für 24 h Stunden mit 2 µM MS-275, 5 µM 5-FU und 5 µM Irinotecan wie abgebildet inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und mit PI gefärbt. Die Zellzyklusanalyse erfolgte am Durchflusszytometer (n=6; MW + SD; two-way ANOVA, Bonferroni Korrektur; \* p≤0,05; \*\* p≤0,01; \*\*\*\* p≤0,0001) (B) HCT116<sup>CC9 ctr.</sup> Zellen und HCT116<sup>PR130 -/-</sup> Zellen wurden für 40 h Stunden mit 2 µM MS-275, 5 µM 5-FU und 5 µM Irinotecan wie abgebildet inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und mit PI gefärbt. Die Zellzyklusanalyse erfolgte am Durchflusszytometer (n=5; MW + SD; two-way ANOVA, Bonferroni Korrektur; \* p≤0,05; \*\* p≤0,01; \*\*\*\* p≤0,0001) (C) Die statistische Auswertung der Ergebnisse der Zellzyklusphasen G1, S und G2 nach 24 h und 40 h in HCT116<sup>PR130 -/-</sup> wurde graphisch gegenübergestellt. (Werte nach 24 h n=6, Werte nach 40 h n=3; MW+SD; Legende für die X-Achse: 1 = contr., 2 = 2 µM MS-275, 3 = 5 µM 5-FU, 4 = 5 µM 5-FU + 2 µM MS-275, 5 = 5 µM Irinotecan, 6 = 5 µM Irinotecan + 2 µM MS-275).

Abbildung 24B stellt die Verteilung der Zellzyklusphasen nach 40 h dar. In den mit 5-FU behandelten Zellen konnte weder in den HCT116<sup>CC9 ctr.</sup>, noch in den HCT116<sup>PR130 -/-</sup>

Zellen ein S-Phase Arrest gemessen werden. Dieser Abfall der S-Phase nach 40 h, im Vergleich zu den Ergebnissen nach 24 h, wird durch den Graphen in Abb. 24C nochmal verdeutlicht. Wird die G1-Phase beider Zelllinien betrachtet, zeigt sich nach wie vor ein signifikanter Verlust dieser Zellzyklusphase. Durch die Kombination von 5-FU mit MS-275 zeigt sich zusätzlich ein starker Anstieg der subG1-Fraktion mit Verlusten der Zellpopulation in der G1-Phase und S-Phase. Weitere Verluste der G1-Phase können in den mittels Irinotecan, einzeln und kombiniert, behandelten Zellen festgestellt werden. Während sich in der Kombination von Irinotecan und MS-275 nach 24 h in beiden Zelllinien ein signifikanter G2-Arrest einstellte (HCT116<sup>CC9 ctr.</sup>: 64,4%; HCT116<sup>PR130 -/-</sup>: 67,1%), zeigten sich in den HCT116<sup>CC9 ctr.</sup> Zellen nach 40 h in der G2-Phase keine signifikanten Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle (Irinotecan + MS-275: 25,3%, Kontrolle: 21,7%). Auch hier ist ein deutlicher *Shift* des Zellzyklus in die subG1-Fraktion erkenntlich (49,1%). In den HCT116<sup>PR130 -/-</sup> Zellen kann in den mit Irinotecan und MS-275 behandelten Zellen das gleiche Verhalten des Zellzyklus in abgeschwächter Form detektiert werden (G1-Phase auf 31,2%; G2-Phase 35,5%; subG1-Phase 28,1%). Wird die subG1 Population beider Zelllinien im Allgemeinen betrachtet, so scheint die Kombination von 5-FU mit MS-275 in HCT116<sup>PR130 -/-</sup> Zellen am sensitivsten auf replikativen Stress zu reagieren, mit einem Anstieg der subG1-Fraktion auf 16,2% nach bereits 24 h. Nach 40 h lässt sich jedoch ein stärkerer Anstieg der subG1-Phase in Reaktion auf sämtliche chemotherapeutische Behandlungen in den HCT116<sup>CC9 ctr.</sup> Zellen feststellen.

Da die subG1-Fraktion fragmentierte DNA darstellt und somit Hinweise auf Apoptose liefert, wurden nähere Untersuchungen zur genaueren Aufschlüsselung der Apoptosevorgänge durch die durchflusszytometrische Zelltodmessung mittels AnnexinV/PI durchgeführt (Abb. 25).



**Abb. 25: Effekte von PR130 in der Zelltodmessung**

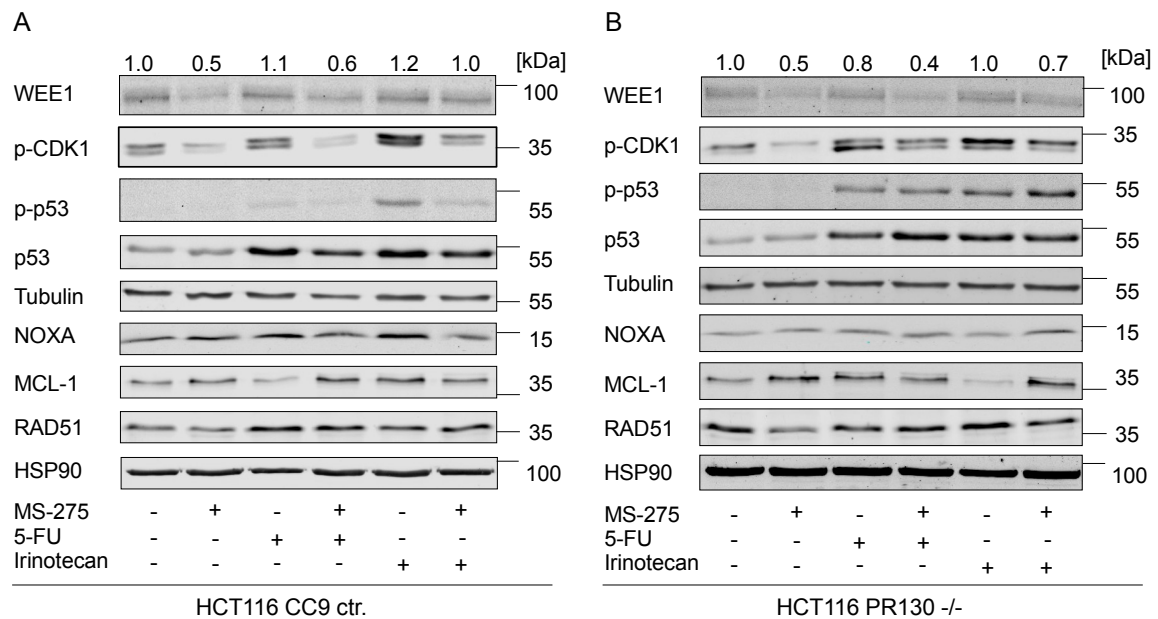
HCT116<sup>CC9 ctr.</sup> und HCT116<sup>PR130 -/-</sup> Zellen wurden mit 2 µM MS-275, 5 µM 5-FU und 5 µM Irinotecan wie abgebildet inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit AnnexinV-FITC und PI und die Analyse am Durchflusszytometer. **(A)** Statistische Auswertung der Zelltodmessung und der viablen Zellen nach 24 h (n=4, MW + SD; two-way ANOVA; Bonferroni Korrektur, \*\* p≤0,01; \*\*\* p≤0,001; \*\*\*\* p≤0,0001). **(B)** Statistische Auswertung der Zelltodmessung und der viablen Zellen nach 40 h (n=4, MW + SD; two-way ANOVA; Bonferroni Korrektur, \* p≤0,05; \*\* p≤0,01; \*\*\*\* p≤0,0001).

Wie Abbildung 25 deutlich zeigt, ist mittels der AnnexinV/PI Färbung in den HCT116<sup>PR130 -/-</sup> nach 24 h Inkubation mit 5-FU und MS-275 ein signifikanter Anstieg der frühen Apoptose (8,0%) und späten Apoptose/Nekrose (9,0%) detektierbar. Die Einzelbehandlung mit 5-FU zeigt im Vergleich zu der Kombinationsbehandlung nur eine geringe Auswirkung auf die Apoptose (frühe Apoptose: 4,2%; späte Apoptose/Nekrose: 4,6%). Innerhalb der HCT116<sup>CC9 ctr.</sup> Zellen zeigt sich zusätzlich zu den Effekten in den mit 5-FU und MS-275 therapierten Zellen (im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle: 3%) auch ein signifikanter Anstieg der frühen Apoptose in den mittels Irinotecan und MS-275 therapierten Zellen auf 10,2% (Abb. 25A). Nach 40 h zeigen beide Zelllinien sowohl in den behandelten Zellkulturen einen weiteren Anstieg der Zelltodrate (siehe Abb. 25B). Insbesondere fällt ein Anstieg der späten Apoptose/Nekrose in den mit Irinotecan und MS-275 behandelten Zellen der HCT116<sup>PR130 -/-</sup> Zellen auf, welche nach 40 h 19,8% beträgt (Vergleich zu 24 h: 5,2%).

Die geringste Induktion von Apoptose wurde in den mit 5-FU einzelbehandelten Zellen der HCT116<sup>PR130 -/-</sup> gemessen (frühe Apoptose nach 40 h: 5,6%; späte Apoptose/Nekrose 13,8%). Allgemein betrachtet, kann, mit Ausnahme von der Kombination mit 5-FU und MS-275, eine höhere Zelltodrate in den PR130 tragenden HCT116 Zellen sowohl nach 24 h als auch nach 40 h festgestellt werden (Abb. 25).

Im nächsten Schritt wurde, wie in dem vorangegangenen Kapitel (Kap. 4.5), die DNA Schadensantwort auf Proteinebene via Western Blot untersucht. Abbildung 26 zeigt den Vergleich zwischen PR130 tragenden HCT116<sup>CC9 ctr.</sup> Zellen und PR130 defizienten HCT116<sup>PR130 -/-</sup> Zellen. In HCT116<sup>CC9 ctr.</sup> Zellen ist eine Reduktion des WEE1 Signals um die Hälfte (Kontrolle *fold induction*: 1,0; 2 µM MS-275 *fold induction*: 0,5) nach 24 h Inkubation mit MS-275 detektierbar. Während die densitometrische Analyse des WEE1 Signals nach Inkubation mit Irinotecan und mit 5-FU weiter ansteigt (5-FU: 1,1; Irinotecan: 1,2), zeigte sich nach wie vor eine Reduktion des Signals nach zusätzlicher Inkubation mit MS-275 (Abb. 26A). Entsprechend den aus der Literatur bekannten Wirkmechanismen konnte ebenfalls eine Reduktion von p-CDK1 nach Behandlung der Zellen mit MS-275 dargestellt werden. Die Analyse von p53 zeigte eine Induktion von p53 in den mit Irinotecan und 5-FU monotherapierten Zellpopulationen. In der Kontrolle sowie in den mittels MS-275 behandelten Zellen konnte hingegen keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression der untersuchten Proteine detektiert werden (Abb. 26A). Eine Phosphorylierung von p53 an Ser15 konnte einzig in der Einzelbehandlung der HCT116<sup>CC9 ctr.</sup> mit Irinotecan deutlich nachgewiesen werden.

In Abbildung 26 werden weitere Proteine des intrinsischen Apoptosesignalwegs dargestellt. Noxa ist ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie. In den HCT116<sup>CC9 ctr.</sup> Zellen ist eine basale Expression von Noxa in allen behandelten und unbehandelten Zellen nachweisbar. Bei genauerer Betrachtung fällt eine leichte Abnahme des Signals in beiden Kombinationstherapien mit MS-275 auf. Mcl-1 ist ebenfalls in allen Zellpopulationen detektierbar. Die geringste Proteinexpression des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 zeigte sich in den mittels 5-FU monotherapierten Zellen. Rad51 wies ein ähnliches Verteilungsmuster wie das Protein p53 auf: in der Kontrolle sowie in den mit MS-275 einzelbehandelten Zellen wurde ein schwächeres Signal detektiert, während die Therapien der weiteren vier Zellpopulationen (Tab. 3) annähernd gleich hohe Level an Rad51 induzierten (Abb. 26A).



**Abb. 26: DNA Schadensantwort in PR130 kompetenten HCT116<sup>CC9 ctr.</sup> und PR130 defizienten HCT116<sup>PR130 -/-</sup>**

(A) HCT116<sup>CC9 ctr.</sup> Zellen und (B) HCT116<sup>PR130 -/-</sup> Zellen wurden für 24 h mit 2 µM MS-275, 5 µM 5-FU, 5 µM 5-FU + 2 µM MS-275, 5 µM Irinotecan und 5 µM Irinotecan + 2 µM MS-275 wie gezeigt inkubiert. Gesamtzellextrakte wurden mittels Western Blot jeweils auf die dargestellten Proteine untersucht. Tubulin und HSP90 dienen als Ladekontrollen (n=2).

Die gleichen Proteine wurden ebenfalls in den HCT116<sup>PR130 -/-</sup> via Western Blot nachgewiesen. Auch hier zeigt Abbildung 26B eine eindeutige Signalreduktion von WEE1 (Densitometrie 0,5) und p-CDK1 nach 24 h Inkubation mit MS-275. Diese Reduktion blieb auch in den Kombinationstherapien erhalten. Im Vergleich zu den PR130 kompetenten Zellen zeigte sich in den HCT116<sup>PR130 -/-</sup> eine zusätzliche Abnahme von WEE1 innerhalb der mit 5-FU einzelbehandelten Zellpopulation. In den Irinotecan behandelten Proben konnte keine Veränderung der Signalstärke im Vergleich zu Kontrolle gemessen werden. Eine deutliche Induktion des Proteins p-CDK1 konnte sowohl in den mit 5-FU als auch mit Irinotecan behandelten Zellen detektiert werden. Obwohl die Signalstärke von p-CDK1 durch die Kombination mit MS-275 wieder abnimmt, ist dennoch ein erhöhtes Vorkommen im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar (Abb. 26B).

Wird das Protein p53 in Abbildung 26B betrachtet, zeigte sich in der Kontrolle und nach einer MS-275 Monotherapie ein deutlich niedrigeres p53 Signal im Vergleich zu den Zellen, die mit 5-FU und Irinotecan sowie den beiden Kombinationstherapien behandelt wurden. Die höchste Proteinsignatur konnte in der Kombinationstherapie

durch MS-275 mit 5-FU detektiert werden. Die Phosphorylierung von p53 durch das Kombinationstherapieschema folgte einem ähnlichen Muster. Die stärkste Phosphorylierung von p53 konnte hierbei in den mittels Irinotecan und MS-275 kombiniert therapierten HCT116<sup>PR130</sup> <sup>-/-</sup> Zellen gemessen werden, während in der Kontrolle und in den MS-275 monotherapierten Zellen kein p-p53 Signal detektiert werden konnte (Abb. 26B). Es konnten keine maßgeblichen Modulationen der Signalstärke von Noxa in den HCT116<sup>PR130</sup> <sup>-/-</sup> Zellen via Western Blot dargestellt werden. Abgesehen von einer Reduktion der Signalstärke von Rad51 in den mit MS-275 monotherapierten Probe, veränderte sich das Vorkommen von Rad51 in den HCT116<sup>PR130</sup> <sup>-/-</sup> auch nach Inkubation gemäß dem Therapieschema (Tab. 3) nicht maßgeblich. Abbildung 26B zeigt zudem ein deutliche Signalabschwächung von Mcl-1 in den mit Irinotecan inkubierten Zellen. Die Kombination mit MS-275 induzierte jedoch wieder Mcl-1. Es konnten daher molekulare Unterschiede in der MCL-1 Expression dargestellt werden, welche jedoch im Zellzyklus zu diesem Zeitpunkt noch nicht reflektiert waren. Zur weiteren Untersuchung und Differenzierung dieses Phänomens wäre eine Proteom oder Transkriptom Analyse gegebenenfalls indiziert.



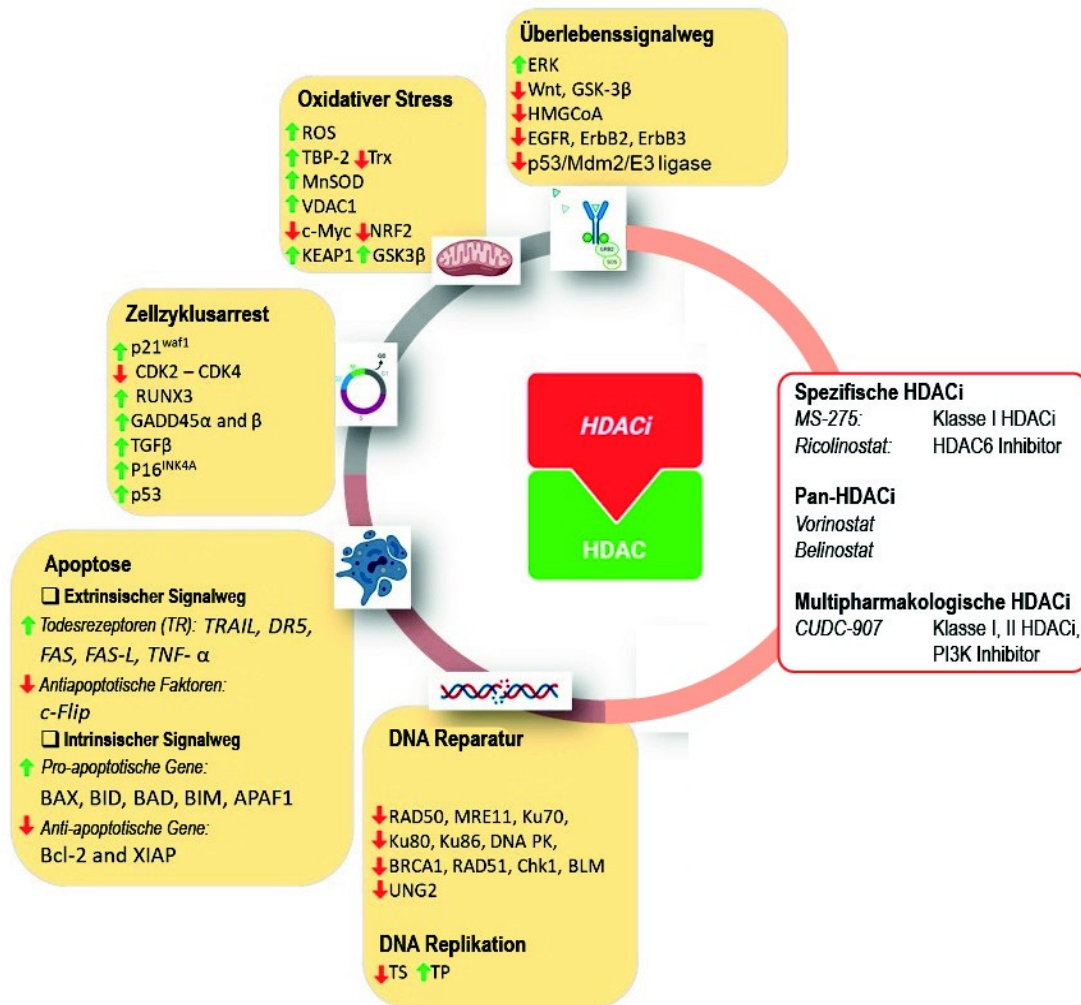
## 5. Diskussion

---

### **5.1 MS-275 arretiert p21 kompetente HCT116 Zellen in der G1-Phase und p21 defiziente HCT116 Zellen in der G2-Phase**

Histondeacetylase (HDACs) fungieren als epigenetische Regulatoren der Zelle, indem sie Histone deacetylieren und somit ein kompaktes Vorliegen des DNA-Histon-Komplexes induzieren (siehe 2.5 ). Hierdurch ist der Ablauf der Transkription behindert und die Expression einzelner Genabschnitte wird somit gehemmt. Die Inhibierung von HDACs, durch sogenannte HDACi, führt zu einer Hyperacetylierung von Histonen und anderer Proteine mit zahlreichen intrazellulären und organischen Auswirkungen (Abb. 27).

HDACs können zudem in Klasse I – IV differenziert werden ( 2.5 ), wodurch sich auch HDACi in unterschiedliche Kategorien einteilen lassen. Bisher bekannt sind unter anderem: selektive HDACi, welche eine spezifische Klasse an HDACs inhibieren, wie beispielsweise MS-275 (HDAC Klasse I Inhibitor) oder Ricolinostat (HDAC6 Inhibitor); pan-HDACi, welche spezifisch zinkabhängige HDACs inhibieren können, wie beispielsweise Vorinostat oder Belinostat; oder multipharmakologische HDACi, welche neben einem HDAC noch eine weitere Zielstruktur inhibieren, wie beispielsweise CUDC-907 (HDAC Inhibitor und PI3K Inhibitor) (Laura Grumetti et al. 2022). 2006 wurde Vorinostat, ein pan-HDACi, erstmals von der US-amerikanischen FDA zur Therapie von kutanen T-Zell-Lymphomen zugelassen (Suraweera, O’Byrne, and Richard 2018). Seither folgten zahlreiche Forschungsarbeiten und Zulassungen weiterer HDACi zur Integration in diverse Tumortherapien.



**Abb. 27: Wirkungsmechanismen auf zellulärer Ebene und Klassifikation der HDACi**

HDACi entfalten ihre Wirkung durch die Modulation unzähliger Prozesse im Organismus. Unter anderem spielen HDACi auf zellulärer Ebene eine Rolle in der DNA-Reparatur, Apoptose, Zellzyklusarrest, Überlebenssignalweg und in der Antwortreaktion auf oxidativen Stress. Zur einfacheren Übersicht können HDACi gemäß ihrer pharmakologischen Wirkung auf die Zielstrukturen in drei Gruppen eingeteilt werden: spezifische HDACi, pan-HDACi und multipharmakologische HDACi. Zu der Gruppeneinteilung der HDACi wurden repräsentative Beispielmittel der jeweiligen Gruppe angegeben. Abbildung modifiziert nach Grumetti et al. 2022.

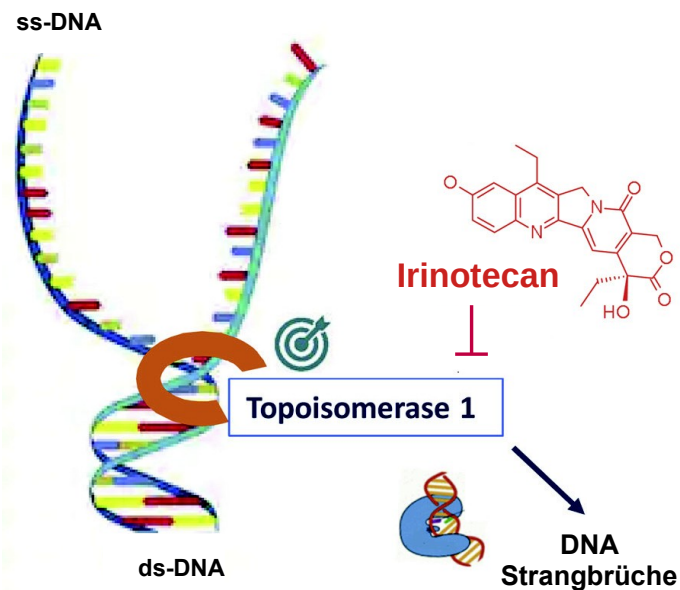
In der Literatur wurden Auswirkungen auf den Zellzyklus durch einen HDACi induzierten G1-Phase Arrest (A. Newbold et al. 2014a) beschrieben. Eine wichtige Rolle in diesem Mechanismus spielt mitunter die p53-unabhängige Induktion von p21 durch HDACi (Richon et al. 1996) welcher die Funktionalität der CDKs und somit die Zellzyklus-*Checkpoints* maßgeblich beeinflusst. Hinweise auf den G1-Arrest zeigten sich ebenfalls anhand der Ergebnisse von HCT116<sup>WT</sup> und HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Zelllinien in dieser Arbeit (Abb. 16). Hinweise auf einen Zusammenhang mit p21 konnten indirekt via Immunoblot durch ein deutlich erhöhtes Vorkommen an p21 nach MS-275

Inkubation in HCT116<sup>p53</sup><sup>-/-</sup> Zellen dargestellt werden (Abb. 22). Zusätzlich wird ein HDACi induzierter G2/M-Phase Arrest in der Literatur beschrieben (Bolden, Peart, and Johnstone 2006; A. Newbold et al. 2014b). Der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Erste Hinweise deuten auf Mechanismen, die unabhängig von DNA-Schäden, und deren aktivierten Signalwegen, wie der p53-p21 Signalkaskade, induziert werden (Andrea Newbold et al. 2016). Abbildung 16 zeigte einzig in HCT116<sup>p21</sup><sup>-/-</sup> Zellen ein Auftreten des G2-Arrests, wodurch die Hypothese, dass es sich um einen p21-unabhängigen Mechanismus handeln könnte, unterstützt wird. Obwohl HDACi in der Monotherapie von soliden Tumoren eine untergeordnete Rolle spielen, konnten synergistische Effekte durch eine Kombination von HDACi mit Fluoropyrimidinen nachgewiesen werden (Fazzone et al. 2009; Terranova-Barberio et al. 2015; Eckschlagler et al. 2017). Infolge dessen wurden die Auswirkungen weiterer konventioneller Chemotherapeutika in Kombination mit HDACi untersucht. Zahlreiche Untersuchungen zeigten ein physiologisches Vorkommen von Klasse I HDACs (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8) und Klasse II HDACs (HDAC4) in gesundem Kolon Gewebe (Wilson et al. 2006; Mariadason 2008) und eine charakteristische Überexpression der HDACs Klasse I in transformierten Kolonkarzinomzellen (B. H. Huang et al. 2005; Mariadason 2008). Das Vorliegen von HDAC6 wird vor allem in Mammakarzinomzellen beschrieben (Zhang et al. 2004), in Kolonkarzinomzellen wurde bisher von keiner HDAC6 Überexpression berichtet (Mariadason 2008). Zusätzlich befindet sich HDAC6 im Gegensatz zu Klasse I HDACs (HDAC1-3) im Zytoplasma, sodass diese keinen Einfluss auf die Histondeacetylierung im Nukleus ausüben (Beyer et al. 2017). Unter Berücksichtigung dieser Umstände, und um die zahlreichen Nebenwirkungen eines pan-HDACi (Van Veggel, Westerman, and Hamberg 2018; Tzogani et al. 2018) zu umgehen, wurde der Klasse I HDACi MS-275 für die weiteren Experimente einer Kombinationstherapie ausgewählt.

## **5.2 Robustheit von HCT116<sup>p21</sup><sup>-/-</sup> Zellen bei Irinotecan Monotherapie**

Der Topoisomerase I Inhibitor Irinotecan ist ein häufig eingesetztes Zytostatikum in der Therapie von soliden Tumoren. Der Wirkmechanismus von Irinotecan beruht auf

einer Bindung mit Topoisomerase I, wodurch ein Protein-gekoppelter DNA-Strangbruch induziert wird (Bailly 2019) (Abb. 28).



### Abb. 28: Irinotecan Wirkungsmechanismus

Irinotecan inhibiert das Enzym Topoisomerase I, welche während der DNA-Replikation benötigt wird. Die Topoisomerase I löst die Supraspiralisierung, welche im Rahmen der eröffneten Replikationsgabel auftritt, indem sie einen Einzelstrangbruch in der DNA herbeiführt. Irinotecan bildet mit Topoisomerase I einen Komplex an der DNA, wodurch zytotoxische, Protein-gekoppelte Einzelstrangbrüche entstehen, die zum Zelluntergang führen (Bailly 2019). Abbildung modifiziert nach Bailly 2019.

Auf Grund steigender Tumorresistenzen gegenüber Irinotecan, beispielsweise durch die erhöhte Expression von Effluxpumpen in der Tumorzelle oder Mutationen der Topoisomerase I (Ozawa et al. 2021), werden neue Medikamente sowie Kombinationstherapie-schemata erforscht um diese Resistenzen zu überwinden. Zu Beginn dieser Arbeit wurden HCT116<sup>WT</sup>, HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> und HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> mit steigenden Konzentrationen an Irinotecan inkubiert. Da der Mechanismus von Irinotecan bereits gut erforscht ist, diente dies vorrangig der Erörterung, ob etwaige Resistenzen innerhalb der knockout Zelllinien vorliegen und ab welcher Dosis diese auf Irinotecan ansprechen. Obwohl in der Theorie hauptsächlich von Irinotecan-induzierten Einzelstrangbrüchen (SSB) gesprochen wird, war es dennoch von Interesse herauszufinden, ob Doppelstrangbrüche (DSB) ebenfalls durch Irinotecan bedingte Störungen der Replikationsgabel auftreten. Um Hinweise auf DSB darzustellen, wurde der ATM/CHK2 Signalweg (Kap. 2.4 ) via Western Blot untersucht. Auf Grund der in Abbildung 7 dargestellten Ergebnissen kann tatsächlich auf eine Aktivierung

des ATM/CHK2 Signalweges rückgeschlossen werden. Diese zeigte sich ab einer Dosis von 5  $\mu\text{M}$  Irinotecan in allen drei Zelllinien. Der ATR/CHK1 Signalweg, der vorrangig bei DNA-Einzelstrangbrüchen induziert wird, ließ sich als erstes in den HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> ab einer Dosis von 5  $\mu\text{M}$  Irinotecan nachweisen. Während pCHK1 ab 8  $\mu\text{M}$  Irinotecan auch in den HCT116<sup>WT</sup> Zellen detektiert werden konnte, zeigte sich kein verstärktes Ansprechen von pCHK1 innerhalb der HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup>. Die Zellzyklusanalyse (Abb. 8) und Apoptosemessung (Abb. 9) zeigten ebenfalls ein sensitiveres Ansprechen der HCT116<sup>WT</sup> Zelllinien. HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zellen wiesen hingegen eine Robustheit gegenüber Irinotecan auf. Ein signifikanter G2-Arrest zeigte sich erst ab höheren Konzentrationen von Irinotecan (5  $\mu\text{M}$ ) und es konnte eine deutlich geringere Apoptoserate von HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> innerhalb der gesamten Dosisreihe nachgewiesen werden (Abb. 8). Obwohl in der Literatur gezeigt werden konnte, dass Irinotecan in p21 defizienten HCT116 Zellen eine erhöhte Apoptoserate induzierte (Hayward et al. 2003; Origanti et al. 2013; Gartel 2009), konnte dies in dieser Arbeit nicht repliziert werden. Weitere Studien berichteten jedoch von einer erhöhten Chemosensibilität durch p21 Expression. Durch den Verlust von p21 in Kolonkarzinomzellen, Ovarialkarzinomzellen oder Hepatozyten konnte subsequent einer verringerte Apoptoserate und erhöhte Resistenz gegenüber Cisplatin (Lincet et al. 2000), 5-FU (Chinery et al. 1997) und Desoxycholsäure (Qiao et al. 2002) beschrieben werden. In Anbetracht der Ergebnisse in 4.2.1 kann eine ähnliche proapoptotische Rolle von p21 in HCT116 Zellen vermutet werden, weshalb HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zellen erhöhte Resistenzen zusätzlich gegenüber Irinotecan aufweisen könnten. Mögliche Parameter, die durch den Verlust von p21 betroffen sind, könnten alternative Zellzyklus- und Apoptosesignalwege oder Mechanismen der Zytostatika Aufnahme und Metabolisierung sein. Weitere Untersuchungen in diese Richtung scheinen sinnvoll zu sein.

### **5.2.1 Irinotecan mit MS-275 reduziert die inhibitorische Phosphorylierung von CDK1 in HCT116<sup>WT</sup> Zellen**

Während die Kombinationstherapie von Irinotecan mit MS-275 nach 24 h HCT116<sup>WT</sup> Zellen in der G2-Phase arretiert (Abb. 17), zeigte sich nach weiteren 24 h ein *Shift* in die subG1-Fraktion (Abb. 20). Durch die Apoptosemessung mit AnnexinV/PI konnte

eine signifikant erhöhte Apoptose ermittelt werden, welche verglichen mit den beiden knockout Zelllinien in den HCT116<sup>WT</sup> Zellen am stärksten ausgeprägt war (Abb. 19). Dieser synergistische Effekt von Irinotecan mit einem HDACi ist kongruent zur aktuellen Literatur (Na et al. 2011). Interessanterweise zeigte sich in Abbildung 22 in HCT116<sup>WT</sup> Proben auf molekularer Ebene eine deutliche Reduktion der CDK1 Phosphorylierung mit einer zusammenhängenden Verminderung von WEE1 durch diese Kombinationstherapie. In Anbetracht dieser Ergebnisse und den bereits bekannten Wirkmechanismen von Irinotecan (Kap. 2.2 ), HDACi (Kap. 2.5 ) und Zellzyklusregulation (Kap. 2.3 ), kann die Hypothese, dass es sich hierbei um Auswirkungen einer mitotischen Katastrophe handeln könnte, wie folgt aufgestellt werden. Eine Eliminierung der inhibitorischen Phosphorylierung von CDK1 bewirkt die Aktivierung des CDK1/Cyclin A-Komplexes und einen Wiedereintritt der Zelle in den Zellzyklus. Der CDK1/Cyclin A-Komplex spielt über seine Interaktion mit dem CDC6, CDT1 und MCM2-7 Komplex (Arias and Walter 2007) eine regulatorische Rolle in der Aktivierung der DNA-Replikationsursprünge („*ORI: origin of replication*“) (Katsuno et al. 2009). Hierdurch wird erneut die DNA Replikation initiiert („*ORI firing*“). Jedoch besteht nach wie vor eine Topoisomerase I Hemmung durch die Irinotecan Behandlung der Zellen, sodass DNA-Strangbrüche akkumulieren. Durch den fehlenden Zellzyklusarrest können diese DNA Schäden nicht ausreichend repariert werden und die mitotische Katastrophe schreitet voran. Dieser Mechanismus könnte die in Abbildung 19 dargestellte erhöhte Apoptose durch die Kombinationstherapie von Irinotecan mit MS-275 begründen. In den knockout Zelllinien konnte keine entsprechend starke Reduktion der CDK1 Phosphorylierung (Abb. 22) mit einem folgenden *Shift* der Zellen aus der G2-Phase in die subG1-Fraktion dargestellt werden (Abb. 17, 20). Aus diesen Gründen, und wegen der im Vergleich zu den HCT116<sup>WT</sup> Zellen niedrigeren Apoptoserate, scheint der Mechanismus des gesteigerten *ORI firings* in den HCT116 knockout Zelllinien eine untergeordnete Rolle zu spielen. Dennoch zeigten die Ergebnisse aus Kapitel 4.4 , dass die Kombinationstherapie aus Irinotecan mit MS-275 zumindest für den Wildtyp einen validen Ansatz in der antitumoralen Therapie darstellt.

## 5.2.2 WEE1-Inhibitoren als potentielles Kombinationsherapeutikum in p53 oder p21 defizienten Kolonkarzinomen

Funktionsstörungen des G1/S-Phase *Checkpoints* treten häufig durch p53 Mutationen in Tumorzellen auf. Ohne funktionalen G1/S-Phase *Checkpoint* kann während der ersten Hälfte des Zellzyklus kein Zellzyklusarrest mit anschließendem Reparaturprozess oder Apoptose eingeleitet werden, sodass anfallende DNA-Schäden akkumulieren können. Aus diesem Grund ist die Funktionalität des G2/M-Phase *Checkpoints* essentiell für das Überleben der Tumorzellen um eben diese, zum Teil durch Zytostatika induzierten DNA Schäden, wieder reparieren zu können. Der G2/M-Phase *Checkpoint* unterliegt der Regulation von der Proteinkinase WEE1, welche in multiplen Tumoren überexprimiert wird (Matheson et al. 2016). Die Wirksamkeit von WEE1-Inhibitoren (WEE1i) werden sowohl in präklinischen, als auch in klinischen Studien der Tumorthherapie untersucht. Yin et al. (2018) berichtete über einen synergistischen Effekt von Irinotecan mit dem WEE1i MK1775 in Kolonkarzinomzellen. Insbesondere in p53 defizienten Kolonkarzinomzellen zeigte die Kombination mit MK1775 eine Resensitivierung der Tumorzellen auf Irinotecan. Kim et al. (2016) konnte zusätzlich eindeutig synergistische Effekte einer Kombinationstherapie von 5-FU mit dem WEE1i MK1775 in p53 defizienten Magenkarzinomzellen darstellen. Obwohl von einer WEE1 Überexpression in herkömmlichen kolorektalen Karzinomen nur selten berichtet wurde und die klinische Relevanz von WEE1i noch diskutiert wird, konnten spezifisch in p53 defizienten Zellen deutliche pro-apoptotische Effekte durch WEE1i erzielt werden. Abbildung 22 zeigte in der unbehandelten Kontrolle der HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Zellen ein starkes WEE1-Signal. Eine Kombination von herkömmlichen Chemotherapeutika wie 5-FU und Irinotecan mit einem WEE1 Inhibitor könnte in diesem Fall eine vorteilhafte Wirkung in der Tumorthherapie erzielen. Auch in p21 defizienten HCT116 Zellen, bei denen eine teils nur sehr geringe Reduktion oder gar Zunahme von WEE1 durch die Kombinationstherapie gezeigt wurde (Abb. 22), könnte eine zusätzliche Kombination mit WEE1i von therapeutischem Vorteil sein. Obwohl MK1775 als selektiver WEE1i gilt, wurde dennoch von weiteren Proteininteraktionen über die ATP-Bindungsstelle mit MK1775, beispielsweise an PLK1 (*Polo-like-kinase 1*), berichtet. PLK1 besitzt über eine FOXM1 Phosphorylierung eine promotische Wirkung. Diab et al. (2020) berichtete von einer PLK1 Aktivitätssteigerung durch WEE1i, wodurch Zellen

vermehrt in die Mitose eintraten. Gerade bei Tumorzellen wäre dies ein denkbar ungünstiger Nebeneffekt.

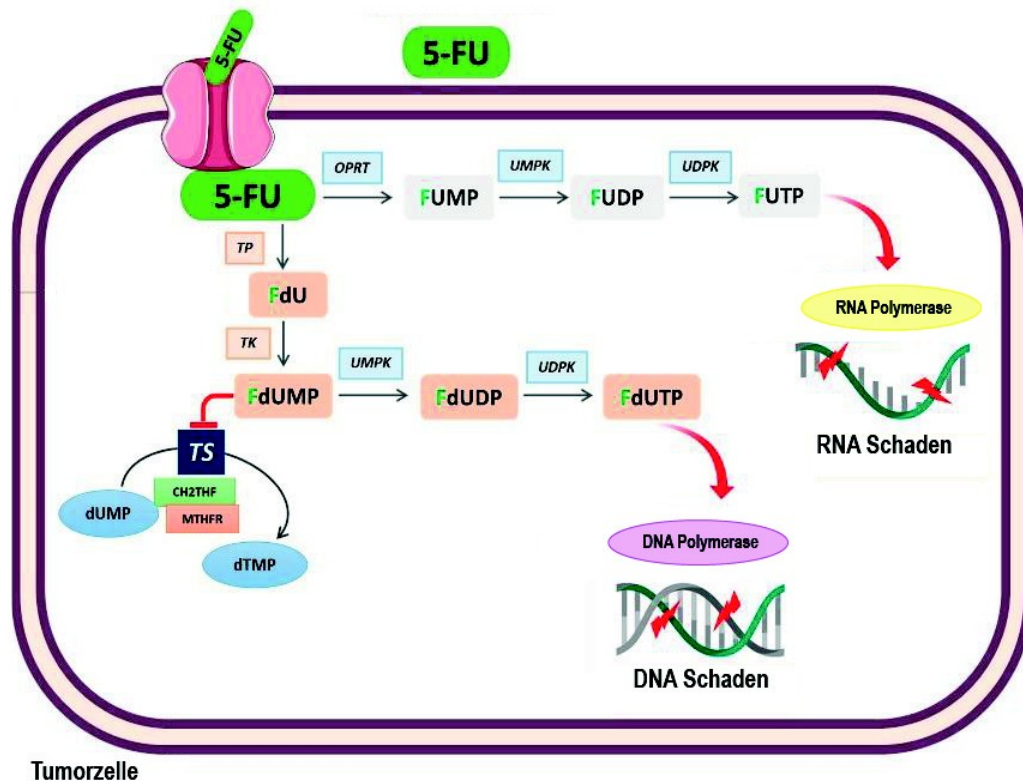
Eine neue Modalität zur besseren Selektivität und Effizienz von Proteinhemmungen wurde mittels Proteolyse-targetierenden-Chimären (PROTACs) erreicht. Diese bestehen aus drei Komponenten: einer Struktur, mit dessen Hilfe das Zielprotein rekrutiert wird, einer E3-Ubiquitinligase und einem sogenannten „Linker“, der die beiden Komponenten miteinander verbindet. PROTACs binden das Zielprotein und bilden mit weiteren Proteinen einen funktionellen Komplex, woraufhin das Zielprotein polyubiquitinyliert und proteasomal abgebaut wird. Die Entwicklung eines WEE1i-PROTAC Wirkstoffes zeigte in verschiedenen Zelllinien eine effektive und spezifische Hemmung von WEE1 (Aublette et al. 2022) und könnte sich nach weiteren klinischen Testungen in Zukunft als wertvoller Kombinationspartner in der Tumorthherapie erweisen.

### **5.3 Resistenzen gegenüber 5-FU Monotherapien in HCT116<sup>p53 -/-</sup> Zellen**

5-FU wird in der Therapie von diversen soliden Tumoren, wie Mammakarzinom, kolorektales Karzinom und Tumore des respiratorischen Trakts, eingesetzt. Der Wirkmechanismus beruht auf der Inkorporation von seinen aktiven Metaboliten 5-Fluorouridin-Triphosphat (5FUTP) und 5-Fluorodeoxyuridin-Triphosphat (5FdUTP) in die DNA und RNA und der Hemmung der Thymidylat-Synthase (Abb. 29).

Die Fähigkeit von 5-FU replikativen Stress zu induzieren, wird in der Literatur bereits ausführlich beschrieben (Longley, Harkin, and Johnston 2003) und werden in 4.2.2 auf ihre Ansprechraten in HCT116 knockout Zelllinien getestet. Wie in 5.2 zeigte sich auch hier die HCT116<sup>p53 -/-</sup> Zelllinie am sensitivsten. Sowohl in HCT116<sup>p53 -/-</sup> und HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zellen zeigten sich Hinweise auf ATR/CHK1 gesteuerte Reparaturmechanismen der Zellen (Abb. 10). Das Apoptoseprofil der HCT116<sup>p53 -/-</sup> zeigte Ähnlichkeiten zu den HCT116<sup>WT</sup> Zellen, während die HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zelllinie, verglichen mit den beiden anderen Zelllinien, die geringste Apoptoserate innerhalb der gesamten Dosisreihe aufwies (Abb. 12). Möglicherweise deutet dies auf erweiterte Resistenzmechanismen bei 5-FU Monotherapien in HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zellen hin.





**Abb. 29: Intrazellulärer Wirkungsmechanismus von 5-FU**

Intravasal verabreichtes 5-FU gelangt über einen Transporter in der Zellmembran in die Tumorzelle. Dort wird es über mehrere Zwischenschritte in FUTP umgewandelt, welches daraufhin durch die RNA-Polymerase in die RNA inkorporiert wird und somit die physiologische RNA Funktion stört. Gleichzeitig findet die Umwandlung von 5-FU in 5-Fluorodeoxyuridin-Monophosphat (5dUMP) statt, welches die TS hemmt. Dies führt zu einer verminderten Umwandlung von dUMP in dTMP. FdUMP wird über weitere Schritte schließlich zu FdUTP synthetisiert, welches über die DNA-Polymerase in die DNA eingebaut wird und zu DNA-Schäden führt. Abbildung modifiziert nach Grumetti et al. 2022.

In der Literatur wurde bereits von zahlreichen Resistenzmechanismen gegenüber 5-FU berichtet. Obwohl 5-FU die stärkste Wirkung in Kolonkarzinomzellen entfaltet, sprechen dennoch nur rund 10% - 20% der metastasierten Kolonkarzinome auf eine Monotherapie an (Maiuthed et al. 2018; Longley, Harkin, and Johnston 2003). Die häufigsten Gründe der Resistenzentwicklung liegen in einer Überexpression spezifischer Enzyme, die für die Metabolisierung von 5-FU eine maßgebliche Rolle spielen. Hierunter ist vor allem die TS (Rahman et al. 2004) hervorzuheben, welche die Umwandlung von dUMP zu dTMP vornimmt. In weiteren Schritten wird dTMP zu dTTP phosphoryliert und bildet einen Pool an Desoxynukleotiden, der essentiell für die DNA-Synthese ist. Ein niedriges Level an TS in Tumorzellen erhöht daher den therapeutischen Effekt von 5-FU, während ein erhöhtes Vorkommen von TS die Sensitivität gegenüber 5-FU vermindert und entscheidend zur Resistenzbildung

beiträgt (Popat 2004). Ein weiteres in soliden Tumoren häufig betroffenes Enzym ist die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD). Diese dient der Eliminierung von 5-FU und baut in einem ersten Schritt bis zu 80% der applizierten 5-FU Dosen in den Hepatozyten ab um dessen Metabolite anschließend renal auszuscheiden. Demzufolge ist die vorliegende Menge an DPD mit dem Ansprechen des Patienten auf 5-FU Therapien assoziiert. Niedrige Level an DPD bergen die Gefahr einer lebensbedrohlichen Toxizität von 5-FU für den Patienten, während durch hohe Level an DPD ein geringes Ansprechen von 5-FU möglich ist (Longley, Harkin, and Johnston 2003; Laura Grumetti et al. 2022). Ein weiterer wichtiger Faktor in der Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika ist der Tumorsuppressor p53. In in-vitro Untersuchungen zeigten sich Hinweise auf eine 5-FU Resistenz in Zellen mit p53 *gain-of-function* Mutationen (Zheng et al. 1999). Auch in-vivo Studien zeigten eine erniedrigte Ansprechrate auf Fluoropyrimidinen in Patienten mit einem *TP53* Mutationsstatus im Vergleich zu Patienten mit dem *TP53* Wildtyp Allel (Benhattar et al. 1996). Der Tumorsuppressor p53 ist in einer Vielzahl von regulatorischen Prozessen des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt (Kap. 2.3 , 2.7 ), welche Auswirkungen auf das zelluläre Ansprechen auf Chemotherapeutika haben. Zusätzlich konnten regulatorische Interaktionen zwischen p53 und TS festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl TS die p53 mRNA bindet, als auch, dass p53 den für die TS Synthese essentiellen *TYMS*-Promotor inhibiert und sich beide Proteine somit gegenseitig beeinflussen (Van Triest et al. 2000). Dies gibt Grund zur Annahme, dass durch den Verlust von p53, zusätzlich zu den Zellzyklus Dysregulationen, ein Hemmmechanismus der TS wegfällt und die TS subsequent vermehrt exprimiert werden kann. Dies führt möglicherweise zu einer erweiterten Resistenzbildung gegenüber dem Chemotherapeutikum 5-FU. Tatsächlich konnte im Rahmen dieser Arbeit nach 48 h Inkubation der Zellen mit 5-FU jedoch eine signifikant vorangeschrittene Zellzyklusdysregulation in den HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Zellen im Vergleich zu den HCT116<sup>WT</sup> Zellen (Abb. 20) detektiert werden. In der subG1-Fraktion (Abb. 17, 20) und in der AnnexinV/PI Zelltodmessung (Abb. 18, 19) finden sich in der 5-FU Monotherapie sowohl nach 24 h als auch nach 48 h keine signifikanten Unterschiede zwischen allen drei Zelllinien. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Zellen bereits basal erhöhten Stress nach 48 h zeigten (Abb. 19). Da TS zellzyklusabhängig exprimiert wird (Dolnick 2003), könnten unterschiedliche Konzentrationen an TS in Zelllinien mit verstärkter

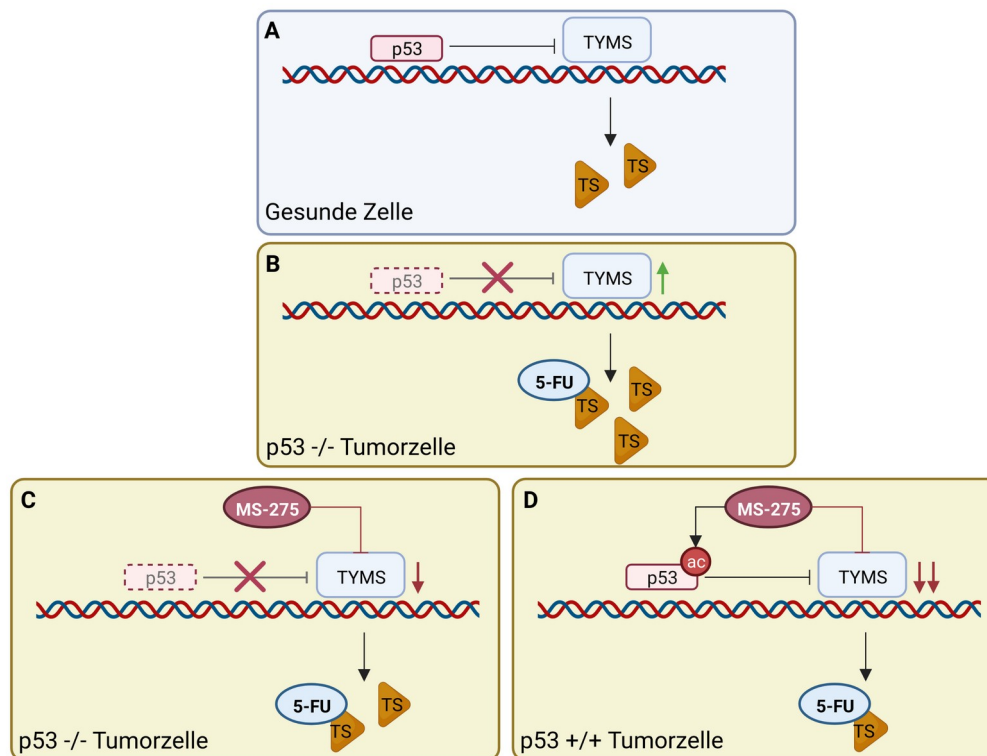
Zellzyklusdysregulation (HCT116<sup>p53 -/-</sup>, HCT116<sup>p21 -/-</sup>) vorliegen. Die Regulation der TS ist zudem ein hochkomplexer Prozess, welcher unter anderem neben transkriptionellen Vorgängen auch post-transkriptionellen, translationalen und post-translationalen Modifikationen (Then 2007) unterliegt, sodass weitere Untersuchungen, beispielsweise via Immunoblot, möglicherweise einen vielversprechenden Ansatz darstellen.

Zusätzlich zeigten *in-vivo* Studien eine inhibierende Wirkung von p53 auf die Expression von DPD. Ein Verlust an p53 zeigte erhöhte Level an DPD und war mit einer schlechten Ansprechrate auf 5-FU und einer damit assoziierten schlechten Überlebensprognose der Patienten verbunden (Gokare et al. 2017). In Anbetracht der geringen Ansprechrate der Tumore auf 5-FU und die Vielzahl an unterschiedlichen Resistenzmechanismen, ist die Untersuchung weiterer Medikamente und Kombinationstherapien bedeutend, um gezielt die Prognose resistenter Tumore zu verbessern. Ein vielversprechender Ansatz konnte in Studien, die Fluoropyrimidine mit HDACi kombinierten, gezeigt werden (Suraweera, O'Byrne, and Richard 2018; Laura Grumetti et al. 2022).

#### **5.4 Kombinationstherapieansätze in HCT116 Zellen mit 5-FU**

In der Literatur konnte *TYMS* als ein Hauptansatzpunkt der HDACi identifiziert werden. Durch die Herunterregulierung des *TYMS* Promotor durch den HDACi Trichostatin A und einer somit erniedrigten Expression an TS konnten Lee et al. (2006) eine Resensitivierung von Tumorzellen gegenüber Fluoropyrimidinen erreichen. MS-275 ist im Gegensatz zu Trichostatin A (Klasse I, II HDACi) ein selektiver Inhibitor der Klasse I HDACs. Die Ergebnisse in Kapitel 4.4 und 4.5 zeigten ebenfalls synergistische Effekte in der kombinierten Anwendung des selektiveren HDACi MS-275 mit 5-FU. Insbesondere HCT116<sup>WT</sup> Zellen zeigten verglichen mit einer 5-FU Einzelbehandlung nach 24 h deutlich vorangeschrittene Zellzyklusdysregulationen (Abb. 17) und erhöhte Apoptose (Abb. 19) in Reaktion auf die Kombinationstherapie nach 48 h. Möglicherweise beruht dieser Effekt auf einem „Zwei-Punkte-Ansatz“, in der MS-275 und p53 auf genetischer Ebene den *TYMS*-Promotor inhibieren, während 5-FU auf Proteinebene bereits exprimierte TS hemmt.

In Folge dessen könnte, im Vergleich zu einem „Ein-Punkt-Ansatz“, eine deutlich effektivere Hemmung von TS in der Zelle gewährleistet werden. Diesem Ansatz müsste in weiteren Untersuchungen nachgegangen werden.



### Abb. 30: Schematische Darstellung des "Zwei-Punkte-Ansatzes" von 5-FU und MS-275 in der Zelle

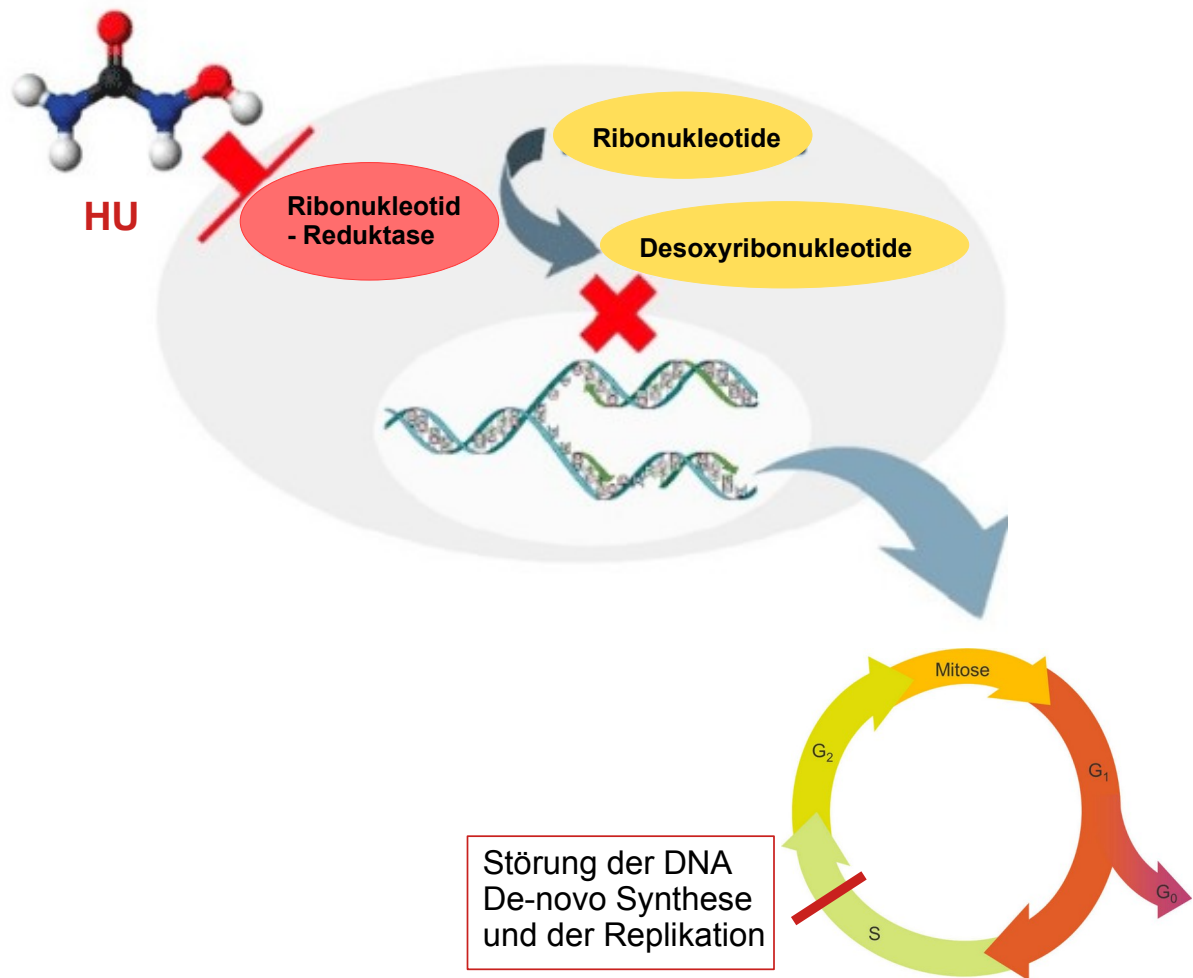
(A) In einer gesunden Zelle kann p53 wie oben beschrieben den *TYMS*-Promotor, welcher essentiell für die TS-Synthese ist, hemmen. Es erfolgt eine physiologische Produktion von TS. (B) In p53 defizienten Tumorzellen fällt die inhibitorische Wirkung von p53 auf den *TYMS*-Promotor weg, sodass erhöhte Level an TS in der Zelle vorliegen. Eine 5-FU Monotherapie ist in solchen Fällen meist wenig effektiv. (C) Die Zugabe von MS-275 in p53 defizienten Tumorzellen bewirkt nun erneut eine Hemmung der TS-Synthese auf genetischer Ebene durch die inhibitorische Wirkung von MS-275 auf den *TYMS*-Promotor. Zusätzlich hemmt 5-FU auf Proteinebene die bereits synthetisierte TS. (D) Dieser Wirkungsansatz ist in p53 produzierenden Tumorzellen möglicherweise durch die duale Hemmung des *TYMS*-Promotors via MS-275 und p53 nochmals verstärkt. Zusätzlich acetyliert MS-275 p53, welches eine wichtige Rolle in der Induktion von Apoptose spielt. (Marx et al. 2021; Benhattar et al. 1996; Van Triest et al. 2000; Rahman et al. 2004). Erstellt mittels biorender.com

In HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Zellen konnte keine signifikant erhöhte Apoptose detektiert werden (Abb. 18, 19). Auf Grund der inhibitorischen Funktion von p53 auf den *TYMS* Promotor, der in HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Zellen wegfällt, könnte eine Überexpression von TS hierdurch möglich sein. Sonnemann et al. (2014) berichtete ebenfalls von einer reduzierten Wirksamkeit von MS-275 in p53 defizienten Zellen im Vergleich zu

anderen HDACi. Marx et al. (2021) konnte des weiteren einen Zusammenhang zwischen MS-275 induzierter Acetylierung von p53, einer MOMP Bildung und einer subsequenter Apoptoseinduktion darstellen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Wirkung von selektiven HDACi, wie MS-275, teilweise von einem funktionalen p53-Signalweg abhängig ist, der in HCT116<sup>p53</sup> <sup>-/-</sup> Zellen nicht mehr gegeben ist. Diese Annahme wird zusätzlich durch die eindeutige Modulation der p53 Phosphorylierung in HCT116 Zellen mit funktionalem p53 unterstützt (Abb. 22). Ein weiterer Ansatzpunkt der *TYMS* Promotor Regulation stellt der Transkriptionsfaktor FOXM1 (Forkhead-box-M1) dar. Varghese et al. (2019) berichtete über eine regulatorische Funktion von FOXM1 auf den *TYMS* Promotor. Die verstärkte Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose konnte durch eine Kombinationstherapie von 5-FU mit dem FOXM1 Inhibitor Thiostrepton insbesondere in 5-FU resistenten und p53 mutierten Zellen dargestellt werden (Varghese et al. 2019). Diese Ergebnisse geben Hoffnung für einen effektiven Alternativansatzpunkt in der Therapie von Kolonkarzinomzellen mit einem p53 Mutationsstatus und/oder einer verminderten 5-FU Sensitivität.

## **5.5 Geringe Wirkungsunterschiede zwischen den HCT116 Zelllinien in Reaktion auf HU**

Hydroxyurea ist ein seit 1967 von der US-amerikanischen FDA zugelassener und gut etablierter Antimetabolit, der überwiegend in der S-Phase des Zellzyklus seine Wirkung entfaltet. Zusätzlich wurde die HU assoziierte Induktion von oxidativen Stress durch ROS Produktion bereits ausführlich in der Literatur beschrieben (M.-E. Huang et al. 2016).



### Abb. 31: Wirkmechanismus von Hydroxyurea

Der Wirkmechanismus von Hydroxyurea (HU) beruht überwiegend auf einer Hemmung des Enzyms Ribonukleotidreduktase. Hierdurch wird die Umwandlung von Ribose zu Desoxyribose gestört, wodurch die De-novo Synthese der DNA und somit die DNA-Replikation in der S-Phase maßgeblich gestört werden (Madaan, Kaushik, and Verma 2012; Timson 1975). Abbildung modifiziert nach Malato et al. (2020) und <https://www.sofatutor.ch/biologie/genetik-und-entwicklungsbiologie/genetik/zytogenetik-meiose-mitose-und-zellzyklus>.

In der Literatur wurde häufig eine Kombination von 5-FU mit HU diskutiert. Durch die kombinierte Hemmung der TS und Ribonukleotidreduktase versprach man sich verstärkte antitumorale Effekte. Durchgeführte Phase II Studien zeigten jedoch widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Effektivität. Während beispielsweise Costanzo et al. (1996) eine Potenzierung der 5-FU Aktivität durch HU beschrieb, berichtete Kaubisch et al. (2004) von keiner verbesserten Effektivität der Kombinationstherapie gegenüber einer Einzeltherapie mit 5-FU oder HU. Beiden Studien gemeinsam war jedoch die erhöhte Rate an gastrointestinalen und hämatotoxischen Nebenwirkungen. Zum Zeitpunkt 2019 ist HU kein Bestandteil der

leitliniengerechten Therapie von kolorektalen Karzinomen (Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) 2019). In Kapitel 4.2.3 konnte dennoch eine gute zytostatische Wirkung von HU in HCT116 Kolonkarzinomzellen dargestellt werden. Abbildung 14 zeigte deutliche S-Phase Arreste im Zellzyklus von HCT116 Zellen. Auch hier diente die Dosisreihe mit HU primär der Untersuchung etwaiger Resistenzen in den verschiedenen Zelllinien. Abbildung 14 zeigte in allen drei Zelllinien keine signifikanten Wirkungsunterschiede, sodass eine ähnliche Effektivität von HU in allen drei Zelllinien angenommen werden kann. Auf molekularer Ebene konnte nichtsdestotrotz eine geringere Phosphorylierung des ATR/CHK1-Signalweges in HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zellen detektiert werden (Abb. 13). Dennoch zeigten sich leicht erhöhte Apoptoseraten in den HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Zellen (Abb. 15), sodass möglicherweise eine bessere Wirksamkeit von HU in p53 *loss-of-function* Zellen vorzufinden ist, während in der HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zelllinie die geringste Apoptoserate messbar war. Dies legt die Vermutung nahe, dass p21 eine wichtige Rolle für den effektiven Ablauf des ATR/CHK1-Signalweges darstellt. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Annahme, dass p21 defiziente Tumorzellen einen Zellzyklusarrest und ein subsequentes Einleiten der Apoptose durch den fehlenden CKI p21 umgehen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass ein „Bypass“ Mechanismus aktiviert wird. Zusätzlich reduzierte Level an phosphoryliertem ATR und CHK1 verringern weiter die Aktivierung funktionaler Intra-S-Phase *Checkpoints*. Möglicherweise reichen 24 h nicht aus um eine Akkumulation zytotoxischer DNA Schäden zu erreichen beziehungsweise um den Desoxyribonukleotid-*Pool* zu depletieren um eine mitotische Katastrophe auszulösen. Die Zelle kann sich zu diesem Zeitpunkt möglicherweise weiter mit fehlerhaftem Genmaterial teilen. Weitere Zelltodmessungen zu späteren Zeitpunkten wären in diesem Falle hilfreich.

## **5.6 Höhere Effektivität einer Kombinationstherapie mit HU und MS-275 in verschiedenen HCT116 Zelllinien**

Obwohl die Kombination von 5-FU mit HU keine eindeutigen Ergebnisse lieferte, ist das Konzept einer kombinierten Hemmung der TS und Ribonukleotidreduktase ein valider Ansatz, der weiter verfolgt werden sollte. In dieser Arbeit wurde HU mit dem

HDACi MS-275 kombiniert, der ebenfalls, unter anderem, eine TS hemmende Wirkung entfaltet (Abb. 27). In der Zellzyklusanalyse konnten nach 24 h primär in der HCT116<sup>WT</sup> Population statistisch signifikante Zellzyklusdysregulationen mit einem S-Phase Arrest detektiert werden. Doch auch in den beiden knockout Zelllinien zeigten sich bereits ein beginnender S-Phase Arrest. Zusätzlich konnten bereits nach 24 h signifikante Anstiege der subG1 Fraktion in HCT116<sup>WT</sup> und HCT116<sup>p53 -/-</sup> Zellen gemessen werden (Abb. 17). Interessanterweise konnten mittels der AnnexinV/PI-Zelltodmessung nach 24 h in keiner Zelllinie signifikante Ergebnisse gemessen werden (Abb. 18). Nach weiteren 24 h zeigten sich hingegen in allen drei Zelllinien signifikant erhöhte Apoptoseraten. Während der Anstieg der Gesamtapoptose in den HCT116<sup>p53 -/-</sup> Zellen verglichen mit den beiden anderen Zelllinien am geringsten ausfiel, so zeigte dennoch einzig die Kombination von HU mit MS-275 einen signifikanten Wirkungseffekt in p53 defizienten Kolonkarzinomzellen. Auch in den HCT116<sup>WT</sup> und HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zellen konnte der höchste Anteil apoptotischer Zellen eindeutig durch die Kombination von HU mit MS-275 nachgewiesen werden (Abb. 19). Obwohl HU ein Antimetabolit, ähnlich wie 5-FU ist, geben die Ergebnisse aus Kapitel 4.4 einen Hinweis darauf, dass die Resistenzlage in HCT116 Zellen gegenüber HU weniger ausgeprägt zu sein scheint. Dafür spricht auch das bessere Ansprechen einer HU Einzelbehandlung in HCT116<sup>WT</sup> und HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zellen im Vergleich zu den 5-FU und MS-275 Einzelbehandlungen (Abb. 20, 19). Insbesondere in HCT116<sup>p21 -/-</sup> Zellen konnte die höchste Apoptose detektiert werden. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass ein Voranschreiten der HU induzierten mitotischen Katastrophe durch das Fehlen eines funktionalen G2/M-Checkpoints in p21 defizienten Zellen (Andreassen et al. 2001) weiter vorangetrieben wird.

Allen in dieser Arbeit durchgeführten Kombinationstherapie ist jedoch gemeinsam, dass MS-275 hauptsächlich den Wirkmechanismus der Chemotherapien zu potenzieren scheint. Hiermit ist eine eindeutige Dominanz des Wirkungsmechanismus der Chemotherapeutika gegenüber dem der HDACi dargestellt (Abb. 16, 17, 20).



## 5.7 Einfluss von PR130 auf den CDK1 Phosphorylierungsstatus

Aberrante, ubiquitäre Phosphorylierungen und somit unkontrollierte Aktivierung diverser Signalwege sind häufig mit neoplastischen Transformationen assoziiert. Ein wichtiger Gegenspieler hierzu sind Proteinphosphatasen, wie beispielsweise PP2A. Diese können aberrante Phosphorylierungen detektieren und dephosphorylieren. PP2A wurde als „Masterregulator“ des Zellzyklus beschrieben, da es mehr als 300 Proteine dephosphoryliert (Stand 2016), die bei der Regulation des Zellzyklus eine Rolle spielen (Wlodarchak and Xing 2016). PP2A spielt daher eine signifikante Rolle in der Apoptose und Zellzyklusregulation und ein Verlust von PP2A, oder eine ihrer Untereinheiten, korrelieren häufig mit der Entstehung von Neoplasien (Perrotti and Neviani 2013). In verschiedenen Tumoren wurde zwar dysfunktionale oder fehlende PP2A detektiert, jedoch ist noch wenig über die Reaktion von Tumorzellen mit fehlender PP2A Untereinheit PR130 auf diverse Chemotherapien bekannt. Wie Abbildung 23 zusätzlich demonstrierte, konnte in allen drei Zelllinien PR130 detektiert werden und durch unterschiedliche Chemotherapeutika zusätzlich induziert werden. Dies scheint Hinweise darauf zu liefern, dass p53 und p21 in der Induktion von PR130 möglicherweise eine untergeordnete Rolle spielen, da selbst in den knockout Zellen eine verstärkte Induktion von PR130 durch die Kombinationstherapie, sowie durch MS-275 einzeln, detektiert werden konnte (Abb. 23). Im nächsten Schritt wurde in Kapitel 4.6 mittels Durchflusszytometrie und Western Blot Analysen die Auswirkungen einer Therapie mit den für Kolonkarzinome gängigen Chemotherapeutika Irinotecan und 5-FU einzeln sowie in Kombination mit dem HDACi MS-275 getestet.

Wie bereits in Kapitel 4.6 beschrieben, konnten anhand der Zellzyklusanalysen sowohl in PR130 exprimierenden als auch PR130 defizienten Zellen Zellzyklusveränderungen, die für das jeweilige Chemotherapeutikum charakteristisch sind, nachgewiesen werden (Abb. 24). Hierbei zeigte sich ebenfalls eine eindeutige Dominanz in der Wirkung von „klassischen“ Chemotherapeutika wie 5-FU, Irinotecan und HU auf den Zellzyklus gegenüber dem HDACi MS-275. MS-275 einzeln bewirkt, wie in Kapitel 4.3 beschrieben, zusammengefasst eine Reduktion der S-Phase mit G1-Phase Anstieg in HCT116<sup>WT</sup> und HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> Zellen und einen G2-Phase Arrest mit einer Reduktion der G1-Phase in HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zellen. Wird nun Abbildung 24

betrachtet, zeigten die Zellzyklusprofile der Kombinationstherapie eine größere Ähnlichkeit zu dem der „klassischen“ Chemotherapeutika als zu dem Zellzyklusprofil der MS-275 Einzeltherapie. Die Zugabe von MS-275 konnte die Effekte von Irinotecan und 5-FU auf den Zellzyklus jedoch teilweise verstärken (Abb. 24). Diese Ergebnisse konnten in einem ähnlichen Ausmaß in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte eindeutig gezeigt werden, dass nach 40 h eine Kombinationstherapie den Ablauf des Zellzyklus deutlich stört und die Zellen vermehrt in die subG1-Fraktion rutschen (Abb. 24B). Dieses Phänomen trat in HCT116<sup>CC9 ctr.</sup> Zellen verglichen mit den PR130 defizienten Zellen verstärkter auf, jedoch nicht signifikant. Somit scheint PR130 zwar Auswirkungen auf die Zellzyklusregulation zu haben, jedoch konnte mittels Zellzyklusanalysen kein eindeutig signifikanter Einfluss von PR130 auf die Wirksamkeit eines HDACi bewiesen werden.

Verglichen mit den PR130 nativen HCT116 Zellen zeigte sich in HCT116<sup>PR130 -/-</sup> Zellen eine geringere Dephosphorylierung von CDK1 durch die Kombinationstherapie im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien (Abb. 26). Demnach ist es möglich, dass das Fehlen der Untereinheit PR130 bereits Auswirkungen auf die Funktionalität von PP2A hat und die inhibitorische Phosphorylierung von CDK1 kann auf Proteinebene länger aufrecht erhalten werden.

Das Vorkommen von p53 scheint unabhängig vom PR130 Status in beiden Zelllinien in Gegenwart von Irinotecan und 5-FU einzeln und in Kombination mit MS-275 vorzuliegen. Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien zeigten sich hingegen wieder im Phosphorylierungsstatus von p53 (Abb. 26). Auch hier scheint die dephosphorylierende Wirkung von PP2A eine Rolle zu spielen, da in PR130 defizienten Zellen eine eindeutige Hyperphosphorylierung an Ser15 von p53 detektiert werden konnte. Der genaue Wirkmechanismus der hierfür zugrunde liegt, konnte bisher jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. Nachdem p53 eine Zielstruktur multipler Signalkaskaden darstellt, wäre eine umfangreiche Proteinanalyse hierfür notwendig.

## 5.8 Relevanz des PR130 Status in der antitumoralen Therapie

Die Analyse der pro- und anti-apoptischen Proteine NOXA; MCL-1 und RAD51 zeigten unabhängig vom PR130 Status kaum signifikante Veränderungen in der Reaktion auf das Kombinationstherapieschema. Lediglich bei der Analyse von MCL-1 (Abb. 26) ließen sich Unterschiede sowohl zwischen den Chemotherapien als auch zwischen den beiden HCT116 Zelllinien mit unterschiedlichem PR130 Status darstellen. Obwohl diese Differenzen auf molekularer Ebene bereits nachweisbar waren, konnten sich zum Zeitpunkt von 24 h und 40 h noch keine signifikanten Auswirkungen auf den Zellzyklus und die Apoptose nachweisen lassen. Um den zugrundeliegenden Mechanismus und dessen Regulationsansätze zu verstehen, wären auch hier weiterführende Proteom und Transkriptom Analysen durchzuführen.

Zusammenfassend konnten anhand der durchgeführten Experimente in dieser Arbeit keine signifikanten Auswirkungen der Tumorthherapie durch einen veränderten PR130 Status detektiert werden. Dies bedeutet jedoch, dass, vollkommen unabhängig von PR130, mit beiden Kombinationstherapieansätzen eine effektive antitumorale Wirkung erzielt werden kann. Da jedoch der menschliche Organismus aus einem höchst komplexen Zusammenspiel unzähliger Vorgänge und Mechanismen besteht und im Rahmen dessen verschiedene Faktoren einen Einfluss spielen können, die durch *in-vitro* Versuche nicht ausreichend einkalkuliert werden können, sind weitere *in-vivo* Versuche im nächsten Schritt unverzichtbar um die Effekte von PR130 besser zu verstehen.

## 6. Zusammenfassung

---

Das kolorektale Karzinom ist der zweithäufigste maligne Tumor der Frau und das dritthäufigste Karzinom des Mannes in Deutschland. Die Tumorgenese beruht auf einer progredienten Akkumulation von genetischen Mutationen, welche besonders häufig den Tumorsuppressor p53 betreffen (Fearon and Vogelstein 1990).

Für die Therapie des Kolonkarzinoms sind bereits mehrere Kombinationstherapieschemata wie FOLFOX und FOLFIRI gut etabliert ("S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom" 2019). Zunehmende Resistenzentwicklungen, insbesondere gegenüber 5-FU stellen jedoch immer größer werdende Herausforderungen in der adäquaten Tumortherapie dar, sodass die Erforschung neuer Medikamente und Kombinationspartner, sowie deren intrazelluläre Wirkmechanismen, einen essentiellen Forschungsbereich darstellt. Die Wirkstoffgruppe der HDACi spielen als Einzeltherapie in der Behandlung von soliden Tumoren zwar eine untergeordnete Rolle, jedoch konnten insbesondere in der Kombination mit Fluoropyrimidinen bereits vielversprechende, synergistische Effekte in der Literatur beschrieben werden (Lee et al. 2006; Laura Grumetti et al. 2022).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Synergismus von MS-275, ein Klasse I HDACi, in Kombination mit 5-FU ebenfalls bestätigt werden. Zusätzlich zeigten sich synergistische Effekte in der Kombination von MS-275 mit Irinotecan, einem Topoisomerase I Inhibitor, und HU, einem Antimetabolit. Diese synergistischen Effekte konnten sowohl in nativen HCT116<sup>WT</sup> Zellen, als auch in den *knockout* Zelllinien HCT116<sup>p53<sup>-/-</sup></sup> und HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zellen nachgewiesen werden. Zusammengefasst konnten mittels Zellzyklusanalysen in allen drei Zelllinien ein S-Phase Arrest mit G1-Phase Verlust durch die Kombinationstherapie von 5-FU mit MS-275 detektiert werden. Nach 48 h konnte durch diese Kombinationstherapie ein deutlicher Anstieg der Apoptose im Vergleich zur Einzeltherapie mit 5-FU in HCT116<sup>WT</sup> und HCT116<sup>p21<sup>-/-</sup></sup> Zellen detektiert werden (Abb. 17-20). Die Kombination von HU mit MS-275 zeigte eine ähnliche Wirkung auf den Zellzyklus wie die Kombination von 5-FU mit MS-275. Es konnte jedoch nach 48 h die höchste Apoptoserate in allen drei HCT116 Zelllinien durch die Kombination von HU mit MS-275 gemessen werden (Abb. 19). Irinotecan bewirkte in allen HCT116 Zelllinien einen

signifikanten G2-Arrest. Durch die Kombination mit MS-275 wurde dieser Effekt verstärkt. In HCT116<sup>WT</sup> Zellen bestand nach 48 h kein G2-Arrest mehr, stattdessen konnte ein *Shift* in die subG1-Fraktion beobachtet werden (Abb. 20). Auf molekularer Ebene zeigten sich insbesondere durch die Kombinationstherapie von Irinotecan mit MS-275 in HCT116<sup>WT</sup> Zellen eine Reduktion von phosphoryliertem CDK1. Wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben, ist dies ein möglicher Hinweis auf eine verstärkte Aktivierung des *ORI firings* mit einer folglich voranschreitenden mitotischen Katastrophe und liefert eine mögliche Erklärung für den zuvor im Zellzyklus gemessenen Anstieg der subG1-Fraktion.

Als neuer Ansatzpunkt der antitumoralen Therapie wurde die katalytische Untereinheit PR130 der PP2A näher betrachtet. PP2A spielt eine wichtige Rolle in der Zellzyklusregulation, unter anderem auf Grund ihrer Fähigkeit aberrante Phosphorylierungen zu detektieren und zu dephosphorylieren. In verschiedenen Tumoren wurde zwar dysfunktionale oder fehlende PP2A detektiert, jedoch ist noch wenig über die Reaktion von Tumorzellen mit fehlender PP2A Untereinheit PR130 auf diverse Chemotherapien bekannt (Perrotti and Neviani 2013). In dieser Arbeit konnte mittels Zellzyklusanalyse sowohl in PR130 produzierenden HCT116 Zellen als auch in HCT116<sup>PR130 -/-</sup> Zellen eine synergistische Wirkung der Kombinationstherapie jeweils von 5-FU und Irinotecan mit MS-275 detektiert werden (Abb. 24, 25). Obwohl auf molekularer Ebene Hinweise auf Unterschiede im Phosphorylierungsstatus von CDK1 und p53 in HCT116<sup>CC9 ctr.</sup> und HCT116<sup>PR130 -/-</sup> Zellen dargestellt werden konnten (Abb. 26), konnten nach 40 h keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien in der Apoptosemessung und Zellzyklusanalyse gemessen werden (Abb. 24, 25). Dies bedeutet jedoch, dass in diesem Fall, unabhängig vom PR130 Status, mit beiden Kombinationstherapieansätzen eine effektive antitumorale Wirkung erzielt werden kann.

Abschließend ist darauf hinzuweisen, dass der menschliche Organismus aus einem höchst komplexen Zusammenspiel unzähliger Vorgänge und Mechanismen besteht und im Rahmen dessen verschiedene Faktoren einen Einfluss haben können, welche durch *in-vitro* Versuche nicht ausreichend einkalkuliert werden können. Aus diesem Grund sind *in-vivo* Versuche in Zukunft unverzichtbar, um die Effekte einer Kombinationstherapie mit MS-275 und den Einfluss von PR130 besser verstehen zu können.

## 7. Literaturverzeichnis

---

- Acehan, Devrim, Xuejun Jiang, David Gene Morgan, John E Heuser, Xiaodong Wang, and Christopher W Akey. 2002. "Three-Dimensional Structure of the Apoptosome: Implications for Assembly, Procaspase-9 Binding, and Activation." *Molecular Cell* 9 (2): 423–32. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00442-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00442-2).
- Adrain, C., E. M. Creagh, and S. J. Martin. 2001. "Apoptosis-Associated Release of Smac/DIABLO from Mitochondria Requires Active Caspases and Is Blocked by Bcl-2." *The EMBO Journal* 20 (23): 6627–36. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6627>.
- Andreassen, Paul R., Françoise B. Lacroix, Olivier D. Lohez, and Robert L. Margolis. 2001. "Neither P21WAF1 Nor 14-3-3 $\sigma$  Prevents G2 Progression to Mitotic Catastrophe in Human Colon Carcinoma Cells after DNA Damage, But P21WAF1 Induces Stable G1 Arrest in Resulting Tetraploid Cells1." *Cancer Research* 61 (20): 7660–68.
- Arias, Emily E., and Johannes C. Walter. 2007. "Strength in Numbers: Preventing Rereplication via Multiple Mechanisms in Eukaryotic Cells." *Genes & Development* 21 (5): 497–518. <https://doi.org/10.1101/gad.1508907>.
- Armaghany, Tannaz, Jon D. Wilson, Quyen Chu, and Glenn Mills. 2012. "Genetic Alterations in Colorectal Cancer." *Gastrointestinal Cancer Research: GCR* 5 (1): 19–27.
- Ärzteblatt, Deutscher Ärzteverlag GmbH, Redaktion Deutsches. 2002. "Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms mit 5-FU/ Folinsäure und Irinotecan." *Deutsches Ärzteblatt*. February 1, 2002. <https://www.aerzteblatt.de/archiv/30290/Therapie-des-metastasierten-kolorektalen-Karzinoms-mit-5-FU-Folinsaeure-und-Irinotecan>.
- Aublette, Marine C., Tom A. Harrison, Elizabeth J. Thorpe, and Morgan S. Gadd. 2022. "Selective Wee1 Degradation by PROTAC Degraders Recruiting VHL and CRBN E3 Ubiquitin Ligases." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, February, 128636. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2022.128636>.
- Bailly, Christian. 2019. "Irinotecan: 25 Years of Cancer Treatment." *Pharmacological Research* 148: 104398. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104398>.
- Bakkenist, Christopher J., and Michael B. Kastan. 2003. "DNA Damage Activates ATM through Intermolecular Autophosphorylation and Dimer Dissociation." *Nature* 421 (6922): 499–506. <https://doi.org/10.1038/nature01368>.
- Barnum, Kevin J., and Matthew J. O'Connell. 2014. "Cell Cycle Regulation by Checkpoints." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1170: 29–40. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2).

- Bartek, Jiri, and Jiri Lukas. 2001. "Mammalian G1- and S-Phase Checkpoints in Response to DNA Damage." *Current Opinion in Cell Biology* 13 (6): 738–47. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00280-5](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00280-5).
- Basiji, David A., William E. Ortyn, Luchuan Liang, Vidya Venkatachalam, and Philip Morrissey. 2007. "Cellular Image Analysis and Imaging by Flow Cytometry." *Clinics in Laboratory Medicine* 27 (3): 653–viii. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2007.05.008>.
- Benhattar, J., J. P. Cerottini, E. Saraga, G. Metthez, and J. C. Givel. 1996. "P53 Mutations as a Possible Predictor of Response to Chemotherapy in Metastatic Colorectal Carcinomas." *International Journal of Cancer* 69 (3): 190–92. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19960621\)69:3<190::AID-IJC7>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19960621)69:3<190::AID-IJC7>3.0.CO;2-V).
- Beyer, Mandy, Nicole Kiweler, Siavosh Mahboobi, and Oliver H. Krämer. 2017. "How to Distinguish Between the Activity of HDAC1-3 and HDAC6 with Western Blot." In *HDAC/HAT Function Assessment and Inhibitor Development*, edited by Oliver H. Krämer, 1510:355–64. New York, NY: Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6527-4\\_26](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6527-4_26).
- Blackford, Andrew N., and Stephen P. Jackson. 2017. "ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response." *Molecular Cell* 66 (6): 801–17. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>.
- Bolden, Jessica E., Melissa J. Peart, and Ricky W. Johnstone. 2006. "Anticancer Activities of Histone Deacetylase Inhibitors." *Nature Reviews Drug Discovery* 5 (9): 769–84. <https://doi.org/10.1038/nrd2133>.
- Brandsma, Inger, and Dik C. van Gent. 2012. "Pathway Choice in DNA Double Strand Break Repair: Observations of a Balancing Act." *Genome Integrity* 3 (1): 9. <https://doi.org/10.1186/2041-9414-3-9>.
- Butz, Karin, Caroline Geisen, Angela Ullmann, Hanswalter Zentgraf, and Felix Hoppe-Seyler. 1998. "Uncoupling of P21WAF1/CIP1/SDI1 mRNA and Protein Expression upon Genotoxic Stress." *Oncogene* 17 (6): 781–87. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201995>.
- Cappell, Mitchell S. 2008. "Pathophysiology, Clinical Presentation, and Management of Colon Cancer." *Gastroenterology Clinics of North America, Colon Cancer Screening, Surveillance, Prevention, and Therapy*, 37 (1): 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2007.12.002>.
- Chanoux, Rebecca A., Bu Yin, Karen A. Urtishak, Amma Asare, Craig H. Bassing, and Eric J. Brown. 2009. "ATR and H2AX Cooperate in Maintaining Genome Stability under Replication Stress\*." *Journal of Biological Chemistry* 284 (9): 5994–6003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806739200>.
- Chinery, Rebecca, Jeffrey A. Brockman, Mark O. Peeler, Yu Shyr, R. Daniel Beauchamp, and Robert J. Coffey. 1997. "Antioxidants Enhance the Cytotoxicity of Chemotherapeutic Agents in Colorectal Cancer: A P53-

- Independent Induction of P21WAF1/CIP1 via C/EBP $\beta$ ." *Nature Medicine* 3 (11): 1233–41. <https://doi.org/10.1038/nm1197-1233>.
- Chuang, De-Maw, Yan Leng, Zoya Marinova, Hyeon-Ju Kim, and Chi-Tso Chiu. 2009. "Multiple Roles of HDAC Inhibition in Neurodegenerative Conditions." *Trends in Neurosciences* 32 (11): 591–601. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.06.002>.
- Compton, Carolyn C., and Frederick L. Greene. 2004. "The Staging of Colorectal Cancer: 2004 and Beyond." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 54 (6): 295–308. <https://doi.org/10.3322/canjclin.54.6.295>.
- Costanzo, Francesco Di, Hani Ei-Taani, Damiano Parriani, Maria Tagliaventi, Roberta Bartolucci, Lanfranco Valenti, Luigi Manzione, and Stefan Madejewicz. 1996. "Hydroxyurea May Increase the Activity of Fluorouracil plus Folinic Acid in Advanced Gastrointestinal Cancer: Phase II Study." *Cancer Investigation* 14 (3): 234–38. <https://doi.org/10.3109/07357909609012145>.
- Daniel, Peter. 2003. "Zellzyklus und Apoptose." In *Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien*, edited by Detlev Ganten, Klaus Ruckpaul, Brigitte Schlegelberger, and Christa Fonatsch, 130–84. Molekulare Medizin. Berlin, Heidelberg: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-59343-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-59343-7_5).
- Derheimer, Frederick A., Heather M. O'Hagan, Heather M. Krueger, Sheela Hanasoge, Michelle T. Paulsen, and Mats Ljungman. 2007. "RPA and ATR Link Transcriptional Stress to P53." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (31): 12778–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705317104>.
- Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). 2019. "S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom," 120.
- Di Bernardo, Giovanni, Nicola Alessio, Carmela Dell'Aversana, Fiorina Casale, Diana Teti, Marilena Cipollaro, Lucia Altucci, and Umberto Galderisi. 2010. "Impact of Histone Deacetylase Inhibitors SAHA and MS-275 on DNA Repair Pathways in Human Mesenchymal Stem Cells." *Journal of Cellular Physiology* 225 (2): 537–44. <https://doi.org/10.1002/jcp.22236>.
- Dolnick, Bruce J. 2003. "Regulation of Thymidylate Synthase Gene Expression and Drug Response." In *Fluoropyrimidines in Cancer Therapy*, edited by Youcef M. Rustum, 83–91. Cancer Drug Discovery and Development. Totowa, NJ: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59259-337-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-59259-337-8_5).
- Duprez, Linde, Ellen Wirawan, Tom Vanden Berghe, and Peter Vandenabeele. 2009. "Major Cell Death Pathways at a Glance." *Microbes and Infection*, Forum on mechanisms and roles of cell death during microbial infections, 11 (13): 1050–62. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.08.013>.
- Dzulko, Melanie, Miriam Pons, Andreas Henke, Günter Schneider, and Oliver H. Krämer. 2020. "The PP2A Subunit PR130 Is a Key Regulator of Cell Development and Oncogenic Transformation." *Biochimica et Biophysica Acta*



- (BBA) - *Reviews on Cancer* 1874 (2): 188453.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188453>.
- Eckschlager, Tomas, Johana Plich, Marie Stiborova, and Jan Hrabeta. 2017. "Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (7): E1414. <https://doi.org/10.3390/ijms18071414>.
- Elmore, Susan. 2007. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death." *Toxicologic Pathology* 35 (4): 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
- Fakih, Marwan G. 2015. "Metastatic Colorectal Cancer: Current State and Future Directions." *Journal of Clinical Oncology* 33 (16): 1809–24. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.7633>.
- Fazzone, William, Peter M. Wilson, Melissa J. Labonte, Heinz-Josef Lenz, and Robert D. Ladner. 2009. "Histone Deacetylase Inhibitors Suppress Thymidylate Synthase Gene Expression and Synergize with the Fluoropyrimidines in Colon Cancer Cells." *International Journal of Cancer* 125 (2): 463–73. <https://doi.org/10.1002/ijc.24403>.
- FDA. 2016. "HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION." U.S. Food and Drug Administration.
- Fearon, E. R., and B. Vogelstein. 1990. "A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis." *Cell* 61 (5): 759–67. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-i).
- Finlay A Macrae and Johanna Bendell. 2021. "Clinical Presentation, Diagnosis, and Staging of Colorectal Cancer - UpToDate." 2021. [https://www.uptodate.com/contents/clinical-presentation-diagnosis-and-staging-of-colorectal-cancer?search=colon%20cancer%20staging&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/clinical-presentation-diagnosis-and-staging-of-colorectal-cancer?search=colon%20cancer%20staging&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1).
- Fokas, Emmanouil, Remko Prevo, Ester M. Hammond, Thomas B. Brunner, W. Gillies McKenna, and Ruth J. Muschel. 2014. "Targeting ATR in DNA Damage Response and Cancer Therapeutics." *Cancer Treatment Reviews* 40 (1): 109–17. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.03.002>.
- Fulda, S., and K.-M. Debatin. 2006. "Extrinsic versus Intrinsic Apoptosis Pathways in Anticancer Chemotherapy." *Oncogene* 25 (34): 4798–4811. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209608>.
- Gartel, Andrei L. 2009. "P21 WAF1/CIP1 and Cancer: A Shifting Paradigm?" *BioFactors* 35 (2): 161–64. <https://doi.org/10.1002/biof.26>.
- Gartel, Andrei L., and Senthil K. Radhakrishnan. 2005. "Lost in Transcription: P21 Repression, Mechanisms, and Consequences." *Cancer Research* 65 (10): 3980–85. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3995>.

- Göder, Anja. 2019. "HDAC1/HDAC2 and PR130 Modulate Checkpoint Kinase-Dependent Cell Fate Decisions during Replicative Stress." Johannes Gutenberg-Universität Mainz. <https://doi.org/10.25358/OPENSCIENCE-961>.
- Göder, Anja, Claudia Emmerich, Teodora Nikolova, Nicole Kiweler, Maria Schreiber, Toni Kühl, Diana Imhof, et al. 2018. "HDAC1 and HDAC2 Integrate Checkpoint Kinase Phosphorylation and Cell Fate through the Phosphatase-2A Subunit PR130." *Nature Communications* 9 (1): 764. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03096-0>.
- Gokare, Prashanth, Niklas K. Finnberg, Phillip H. Abbosh, Jenny Dai, Maureen E. Murphy, and Wafik S. El-Deiry. 2017. "P53 Represses Pyrimidine Catabolic Gene Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPYD) Expression in Response to Thymidylate Synthase (TS) Targeting." *Scientific Reports* 7 (1): 9711. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09859-x>.
- Gui, C.-Y., L. Ngo, W. S. Xu, V. M. Richon, and P. A. Marks. 2004. "Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor Activation of P21WAF1 Involves Changes in Promoter-Associated Proteins, Including HDAC1." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (5): 1241–46. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307708100>.
- Harold Frucht, Aimee L Lucas. 2020. "Molecular Genetics of Colorectal Cancer." *UpToDate*. [https://www.uptodate.com/contents/molecular-genetics-of-colorectal-cancer?search=molecular%20genetics%20of%20colorectal%20cancer&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/molecular-genetics-of-colorectal-cancer?search=molecular%20genetics%20of%20colorectal%20cancer&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1).
- Haschka, Manuel D., Claudia Soratroi, Susanne Kirschnek, Georg Häcker, Richard Hilbe, Stephan Geley, Andreas Villunger, and Luca L. Fava. 2015. "The NOXA–MCL1–BIM Axis Defines Lifespan on Extended Mitotic Arrest." *Nature Communications* 6 (1). <https://doi.org/10.1038/ncomms7891>.
- Hayward, Richard L., Janet S. Macpherson, Jeff Cummings, Brett P. Monia, John F. Smyth, and Duncan I. Jodrell. 2003. "Antisense Bcl-XI Down-Regulation Switches the Response to Topoisomerase I Inhibition from Senescence to Apoptosis in Colorectal Cancer Cells, Enhancing Global Cytotoxicity." *Clinical Cancer Research* 9 (7): 2856–65.
- Heinrich et al. 2014. *Löffler/Petrides: Biochemie Und Pathobiochemie*. 9. Auflage. Springer Verlag.
- Hofheinz, and Arnold. 2018. "Kolonkarzinom." Connector. Onkopedia. 2018. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/kolonkarzinom>.
- Huang, B. H., M. Laban, C. H.-W. Leung, L. Lee, C. K. Lee, M. Salto-Tellez, G. C. Raju, and S. C. Hooi. 2005. "Inhibition of Histone Deacetylase 2 Increases Apoptosis and P21Cip1/WAF1 Expression, Independent of Histone Deacetylase 1." *Cell Death & Differentiation* 12 (4): 395–404. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401567>.

- Huang, Meng-Er, Céline Facca, Zakaria Fatmi, Dorothée Baille, Safia Bénakli, and Laurence Vernis. 2016. "DNA Replication Inhibitor Hydroxyurea Alters Fe-S Centers by Producing Reactive Oxygen Species in Vivo." *Scientific Reports* 6 (1): 29361. <https://doi.org/10.1038/srep29361>.
- "HYDREA (Hydroxyurea) Capsules, for Oral Use Initial U.S. Approval: 1967." n.d. Accessed April 10, 2020. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2019/016295s051lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/016295s051lbl.pdf).
- Jin, P, Y Gu, and D O Morgan. 1996. "Role of Inhibitory CDC2 Phosphorylation in Radiation-Induced G2 Arrest in Human Cells." *Journal of Cell Biology* 134 (4): 963–70. <https://doi.org/10.1083/jcb.134.4.963>.
- Kastan, Michael B., and Dae-sik Lim. 2000. "The Many Substrates and Functions of ATM." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1 (3): 179–86. <https://doi.org/10.1038/35043058>.
- Katsuno, Yuko, Ayumi Suzuki, Kazuto Sugimura, Katsuzumi Okumura, Doaa H. Zineldeen, Midori Shimada, Hiroyuki Niida, Takeshi Mizuno, Fumio Hanaoka, and Makoto Nakanishi. 2009. "Cyclin A–Cdk1 Regulates the Origin Firing Program in Mammalian Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (9): 3184–89. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809350106>.
- Kaubisch, Andreas, Ron Kaleya, Hilda Haynes, Alla Rozenblit, and Scott Wadler. 2004. "Phase II Clinical Trial of Parenteral Hydroxyurea in Combination with Fluorouracil, Interferon and Filgrastim in the Treatment of Advanced Pancreatic, Gastric and Neuroendocrine Tumors." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 53 (4): 337–40. <https://doi.org/10.1007/s00280-003-0727-4>.
- Khosravi-Far, Roya, and Eileen White, eds. 2008. *Programmed Cell Death in Cancer Progression and Therapy*. Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 615. Berlin: Springer.
- Kim, Hye-Young, Yunhee Cho, HyeokGu Kang, Ye-Seal Yim, Seok-Jun Kim, Jaewhan Song, and Kyung-Hee Chun. 2016. "Targeting the WEE1 Kinase as a Molecular Targeted Therapy for Gastric Cancer." *Oncotarget* 7 (31): 49902–16. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10231>.
- Kim, M. S., H. J. Kwon, Y. M. Lee, J. H. Baek, J. E. Jang, S. W. Lee, E. J. Moon, et al. 2001. "Histone Deacetylases Induce Angiogenesis by Negative Regulation of Tumor Suppressor Genes." *Nature Medicine* 7 (4): 437–43. <https://doi.org/10.1038/86507>.
- Krämer, Oliver H., Martin Göttlicher, and Thorsten Heinzel. 2001. "Histone Deacetylase as a Therapeutic Target." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 12 (7): 294–300. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(01\)00438-6](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(01)00438-6).
- Kurosaka, Kahori, Munehisa Takahashi, Naoko Watanabe, and Yoshiro Kobayashi. 2003. "Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages." *The Journal of Immunology* 171 (9): 4672–79. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.9.4672>.

- Lakin, Nicholas D., Byron C. Hann, and Stephen P. Jackson. 1999. "The Ataxia-Telangiectasia Related Protein ATR Mediates DNA-Dependent Phosphorylation of P53." *Oncogene* 18 (27): 3989–95. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202973>.
- Laura Grumetti et al. 2022. "Epigenetic Approaches to Overcome Fluoropyrimidines Resistance in Solid Tumors."
- Leary, Alexandra, Aurelie Auguste, and Soizick Mesnage. 2016. "DNA Damage Response as a Therapeutic Target in Gynecological Cancers." *Current Opinion in Oncology* 28 (5): 404–411. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000320>.
- Lee, Ju-Hee, Jung-Hyun Park, Yeonjoo Jung, Jee-Hyun Kim, Hyun-Soon Jong, Tae-You Kim, and Yung-Jue Bang. 2006. "Histone Deacetylase Inhibitor Enhances 5-Fluorouracil Cytotoxicity by down-Regulating Thymidylate Synthase in Human Cancer Cells." *Molecular Cancer Therapeutics* 5 (12): 3085–95. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0419>.
- Lesko, Alyssa C., Kathleen H. Goss, Frank F. Yang, Adam Schwertner, Imge Hulus, Kenan Onel, and Jenifer R. Prosperi. 2015. "The APC Tumor Suppressor Is Required for Epithelial Cell Polarization and Three-Dimensional Morphogenesis." *Biochimica et Biophysica Acta* 1854 (3): 711–23. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.12.036>.
- Lieber, Michael R. 2010. "The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway." *Annual Review of Biochemistry* 79: 181–211. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>.
- Lincet, H., L. Poulain, J. S. Remy, E. Deslandes, F. Duigou, P. Gauduchon, and C. Staedel. 2000. "The P21cip1/Waf1 Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Enhances the Cytotoxic Effect of Cisplatin in Human Ovarian Carcinoma Cells." *Cancer Letters* 161 (1): 17–26. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(00\)00586-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(00)00586-3).
- Löbrich, Markus, and Penny A. Jeggo. 2007. "The Impact of a Negligent G2/M Checkpoint on Genomic Instability and Cancer Induction." *Nature Reviews Cancer* 7 (11): 861–69. <https://doi.org/10.1038/nrc2248>.
- Longley, Daniel B., D. Paul Harkin, and Patrick G. Johnston. 2003. "5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies." *Nature Reviews Cancer* 3 (5): 330–38. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>.
- Loughery, Jayne, Miranda Cox, Linda M Smith, and David W Meek. 2014a. "NAR Breakthrough Article Critical Role for P53-Serine 15 Phosphorylation in Stimulating Transactivation at P53-Responsive Promoters," 15.
- Loughery, Jayne, Miranda Cox, Linda M. Smith, and David W. Meek. 2014b. "Critical Role for P53-Serine 15 Phosphorylation in Stimulating Transactivation at P53-Responsive Promoters." *Nucleic Acids Research* 42 (12): 7666–80. <https://doi.org/10.1093/nar/gku501>.

- Madaan, Kapish, Darpan Kaushik, and Tarawanti Verma. 2012. "Hydroxyurea: A Key Player in Cancer Chemotherapy." *Expert Review of Anticancer Therapy* 12 (1): 19–29. <https://doi.org/10.1586/era.11.175>.
- Magnussen, Gry Irene, Ruth Holm, Elisabeth Emilsen, Anne Katrine Ree Rosnes, Ana Slipicevic, and Vivi Ann Flørenes. 2012. "High Expression of Wee1 Is Associated with Poor Disease-Free Survival in Malignant Melanoma: Potential for Targeted Therapy." *PLOS ONE* 7 (6): e38254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038254>.
- Maiuthed, Arnatchai, Chuanpit Ninsontia, Katharina Erlenbach-Wuenssch, Benardina Ndreshkjana, Julienne K. Muenzner, Aylin Caliskan, Husayn Ahmed P., et al. 2018. "Cytoplasmic P21 Mediates 5-Fluorouracil Resistance by Inhibiting Pro-Apoptotic Chk2." *Cancers* 10 (10): 373. <https://doi.org/10.3390/cancers10100373>.
- Mariadason, John M. 2008. "HDACs and HDAC Inhibitors in Colon Cancer." *Epigenetics* 3 (1): 28–37. <https://doi.org/10.4161/epi.3.1.5736>.
- Marx, Christian, Jürgen Sonnemann, Mandy Beyer, Oliver D. K. Maddocks, Sergio Lilla, Irene Hauzenberger, Andrea Piée-Staffa, et al. 2021. "Mechanistic Insights into P53-Regulated Cytotoxicity of Combined Entinostat and Irinotecan against Colorectal Cancer Cells." *Molecular Oncology* 15 (12): 3404–29. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13060>.
- Matheson, Christopher J., Donald S. Backos, and Philip Reigan. 2016. "Targeting WEE1 Kinase in Cancer." *Trends in Pharmacological Sciences* 37 (10): 872–81. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.06.006>.
- Mazouzi, Abdelghani, Georgia Velimezi, and Joanna I. Loizou. 2014. "DNA Replication Stress: Causes, Resolution and Disease." *Experimental Cell Research*, DNA DAMAGE AND REPAIR, 329 (1): 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.09.030>.
- Milazzo, Giorgio, Daniele Mercatelli, Giulia Di Muzio, Luca Triboli, Piergiuseppe De Rosa, Giovanni Perini, and Federico M. Giorgi. 2020. "Histone Deacetylases (HDACs): Evolution, Specificity, Role in Transcriptional Complexes, and Pharmacological Actionability." *Genes* 11 (5): 556. <https://doi.org/10.3390/genes11050556>.
- Mohammad, Helai P., Olena Barbash, and Caretha L. Creasy. 2019. "Targeting Epigenetic Modifications in Cancer Therapy: Erasing the Roadmap to Cancer." *Nature Medicine* 25 (3): 403–18. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0376-8>.
- Mordes, Daniel A., and David Cortez. 2008. "Activation of ATR and Related PIKKs." *Cell Cycle* 7 (18): 2809–12. <https://doi.org/10.4161/cc.7.18.6689>.
- Morrison, Ciaran, Eiichiro Sonoda, Noriaki Takao, Akira Shinohara, Ken-ichi Yamamoto, and Shunichi Takeda. 2000. "The Controlling Role of ATM in Homologous Recombinational Repair of DNA Damage." *The EMBO Journal* 19 (3): 463–71. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.3.463>.

- Na, Young-Soon, Kyung-Ah Jung, Seung-Mi Kim, Yong Sang Hong, Min-Hee Ryu, Se Jin Jang, Dae Hyuk Moon, et al. 2011. "The Histone Deacetylase Inhibitor PXD101 Increases the Efficacy of Irinotecan in in Vitro and in Vivo Colon Cancer Models." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 68 (2): 389–98. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1495-6>.
- Nakanishi, M., H. Ando, N. Watanabe, K. Kitamura, K. Ito, H. Okayama, T. Miyamoto, T. Agui, and M. Sasaki. 2000. "Identification and Characterization of Human Wee1B, a New Member of the Wee1 Family of Cdk-Inhibitory Kinases." *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 5 (10): 839–47. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2000.00367.x>.
- Newbold, A., J. M. Salmon, B. P. Martin, K. Stanley, and R. W. Johnstone. 2014. "The Role of P21waf1/Cip1 and P27Kip1 in HDACi-Mediated Tumor Cell Death and Cell Cycle Arrest in the Eμ-Myc Model of B-Cell Lymphoma." *Oncogene* 33 (47): 5415–23. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.482>.
- Newbold, Andrea, Katrina J. Falkenberg, H. Miles Prince, and Ricky W. Johnstone. 2016. "How Do Tumor Cells Respond to HDAC Inhibition?" *The FEBS Journal* 283 (22): 4032–46. <https://doi.org/10.1111/febs.13746>.
- Oda, E. 2000. "Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of P53-Induced Apoptosis." *Science* 288 (5468): 1053–58. <https://doi.org/10.1126/science.288.5468.1053>.
- Origanti, S., S.-r Cai, A. Z. Munir, L. S. White, and H. Piwnica-Worms. 2013. "Synthetic Lethality of Chk1 Inhibition Combined with P53 and/or P21 Loss during a DNA Damage Response in Normal and Tumor Cells." *Oncogene* 32 (5): 577–88. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.84>.
- Ozawa, Shogo, Toshitaka Miura, Jun Terashima, and Wataru Habano. 2021. "Cellular Irinotecan Resistance in Colorectal Cancer and Overcoming Irinotecan Refractoriness through Various Combination Trials Including DNA Methyltransferase Inhibitors: A Review." *Cancer Drug Resistance* 4 (4): 946–64. <https://doi.org/10.20517/cdr.2021.82>.
- Papamichael, D. 1999. "The Use of Thymidylate Synthase Inhibitors in the Treatment of Advanced Colorectal Cancer: Current Status." *The Oncologist* 4 (6): 478–87. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.4-6-478>.
- Peters, G. J, B van Triest, H. H. J Backus, C. M Kuiper, C. L van der Wilt, and H. M Pinedo. 2000. "Molecular Downstream Events and Induction of Thymidylate Synthase in Mutant and Wild-Type P53 Colon Cancer Cell Lines after Treatment with 5-Fluorouracil and the Thymidylate Synthase Inhibitor Raltitrexed." *European Journal of Cancer* 36 (7): 916–24. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(00\)00026-5](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(00)00026-5).
- Popat, Sanjay. 2004. "Thymidylate Synthase Expression and Prognosis in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Journal of Clinical Oncology* 22 (3): 529–36. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.05.064>.

- Qiao, Liang, Robert McKinstry, Seema Gupta, Donna Gilfor, Jolene J. Windle, Philip B. Hylemon, Steven Grant, Paul B. Fisher, and Paul Dent. 2002. "Cyclin Kinase Inhibitor P21 Potentiates Bile Acid-Induced Apoptosis in Hepatocytes That Is Dependent on P53." *Hepatology* 36 (1): 39–48. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.33899>.
- Rahman et al. 2004. "Thymidylate Synthase as an Oncogene: A Novel Role for an Essential DNA Synthesis Enzyme - ScienceDirect." 2004. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610804000807?via%3Dihub>.
- Riballo, Enriqueta, Martin Kühne, Nicole Rief, Aidan Doherty, Graeme C. M. Smith, María-José Recio, Caroline Reis, et al. 2004. "A Pathway of Double-Strand Break Rejoining Dependent upon ATM, Artemis, and Proteins Locating to  $\gamma$ -H2AX Foci." *Molecular Cell* 16 (5): 715–24. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.029>.
- Richon, V. M., T. W. Sandhoff, R. A. Rifkind, and P. A. Marks. 2000. "Histone Deacetylase Inhibitor Selectively Induces P21WAF1 Expression and Gene-Associated Histone Acetylation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (18): 10014–19. <https://doi.org/10.1073/pnas.180316197>.
- Richon, V. M., Y. Webb, R. Merger, T. Sheppard, B. Jursic, L. Ngo, F. Civoli, R. Breslow, R. A. Rifkind, and P. A. Marks. 1996. "Second Generation Hybrid Polar Compounds Are Potent Inducers of Transformed Cell Differentiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (12): 5705–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.5705>.
- Rock, Kenneth L., and Hajime Kono. 2008. "The Inflammatory Response to Cell Death." *Annual Review of Pathology* 3: 99–126. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151456>.
- Rogakou, Emmy P., Chye Boon, Christophe Redon, and William M. Bonner. 1999. "Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks in Vivo." *Journal of Cell Biology* 146 (5): 905–16. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.5.905>.
- Roisin M Connolly et al. 2017. "Entinostat: A Promising Treatment Option for Patients with Advanced Breast Cancer." 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5618943/>.
- Roos, Wynand P., Adam D. Thomas, and Bernd Kaina. 2016. "DNA Damage and the Balance between Survival and Death in Cancer Biology." *Nature Reviews. Cancer* 16 (1): 20–33. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.2>.
- Satyanarayana, A., and P. Kaldis. 2009. "Mammalian Cell-Cycle Regulation: Several Cdk, Numerous Cyclins and Diverse Compensatory Mechanisms." *Oncogene* 28 (33): 2925–39. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.170>.
- Schäfer, Claudia. 2015. "Modulation of the Replication Stress Response by Histone Deacetylases Is Connected to Suppression of the PP2A Regulatory Subunit PR130," January. [https://www.db-thueringen.de/receive/dbt\\_mods\\_00025543](https://www.db-thueringen.de/receive/dbt_mods_00025543).

- Schmidt, Matthias, Alexander Rohe, Charlott Platzer, Abdulkarim Najjar, Frank Erdmann, and Wolfgang Sippl. 2017. "Regulation of G2/M Transition by Inhibition of WEE1 and PKMYT1 Kinases." *Molecules* 22 (12): 2045. <https://doi.org/10.3390/molecules22122045>.
- Shrivastav, Meena, Cheryl A. Miller, Leyma P. De Haro, Stephen T. Durant, Benjamin P. C. Chen, David J. Chen, and Jac A. Nickoloff. 2009. "DNA-PKcs and ATM Co-Regulate DNA Double-Strand Break Repair." *DNA Repair* 8 (8): 920–29. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.05.006>.
- Singh, Thiyam Ramsing, Sharmila Shankar, and Rakesh K. Srivastava. 2005. "HDAC Inhibitors Enhance the Apoptosis-Inducing Potential of TRAIL in Breast Carcinoma." *Oncogene* 24 (29): 4609–23. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208585>.
- Somasundaram, Kumaravel, Hongbing Zhang, Yi-Xin Zeng, Yariv Houvras, Yi Peng, Hongxiang Zhang, Gen Sheng Wu, Jonathan D. Licht, Barbara L. Weber, and Wafik S. El-Deiry. 1997. "Arrest of the Cell Cycle by the Tumour-Suppressor BRCA1 Requires the CDK-Inhibitor P21 WAF1/CiP1." *Nature* 389 (6647): 187–90. <https://doi.org/10.1038/38291>.
- Sonnemann, J, C Marx, S Becker, S Wittig, C D Palani, O H Krämer, and J F Beck. 2014. "P53-Dependent and P53-Independent Anticancer Effects of Different Histone Deacetylase Inhibitors." *British Journal of Cancer* 110 (3): 656–67. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.742>.
- Suraweera, Amila, Kenneth J. O'Byrne, and Derek J. Richard. 2018. "Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi." *Frontiers in Oncology* 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2018.00092>.
- Terranova-Barberio, Manuela, Maria Serena Roca, Andrea Ilaria Zotti, Alessandra Leone, Francesca Bruzzese, Carlo Vitagliano, Giosuè Scogliamiglio, et al. 2015. "Valproic Acid Potentiates the Anticancer Activity of Capecitabine in Vitro and in Vivo in Breast Cancer Models via Induction of Thymidine Phosphorylase Expression." *Oncotarget* 7 (7): 7715–31. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6802>.
- Then, Rudolf. 2007. "Thymidylate Synthase." In *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, edited by S. J. Enna and David B. Bylund, 1–10. New York: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60521-5>.
- Timson, J. 1975. "Hydroxyurea." *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 32 (2): 115–31. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(75\)90002-0](https://doi.org/10.1016/0165-1110(75)90002-0).
- Tzogani, Kyriaki, Paula van Hennik, Ita Walsh, Pieter De Graeff, Annika Folin, Jan Sjöberg, Tomas Salmonson, et al. 2018. "EMA Review of Panobinostat (Farydak) for the Treatment of Adult Patients with Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma." *The Oncologist* 23 (5): 631–36. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0301>.



- Ubhi, Tajinder, and Grant W. Brown. 2019. "Exploiting DNA Replication Stress for Cancer Treatment." *Cancer Research* 79 (8): 1730–39. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3631>.
- Van Triest, B., H. M. Pinedo, G. Giaccone, and G. J. Peters. 2000. "Downstream Molecular Determinants of Response to 5-Fluorouracil and Antifolate Thymidylate Synthase Inhibitors." *Annals of Oncology* 11 (4): 385–91. <https://doi.org/10.1023/A:1008351221345>.
- Van Veggel, Mathilde, Elsbeth Westerman, and Paul Hamberg. 2018. "Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Panobinostat." *Clinical Pharmacokinetics* 57 (1): 21–29. <https://doi.org/10.1007/s40262-017-0565-x>.
- Van Dyke, Michael W. 2014. "Lysine Deacetylase (KDAC) Regulatory Pathways: An Alternative Approach to Selective Modulation." *ChemMedChem* 9 (3): 511–22. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201300444>.
- Varghese, Vidhya, Luca Magnani, Narumi Harada-Shoji, Francesco Mauri, Richard M. Szydlo, Shang Yao, Eric W.-F. Lam, and Laura M. Kenny. 2019. "FOXO1 Modulates 5-FU Resistance in Colorectal Cancer through Regulating TYMS Expression." *Scientific Reports* 9 (1): 1505. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38017-0>.
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger. 1995. "A Novel Assay for Apoptosis. Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on Early Apoptotic Cells Using Fluorescein Labelled Annexin V." *Journal of Immunological Methods* 184 (1): 39–51. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00072-i](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-i).
- Wallberg, Fredrik, Tencho Tenev, and Pascal Meier. 2016. "Analysis of Apoptosis and Necroptosis by Fluorescence-Activated Cell Sorting." *Cold Spring Harbor Protocols* 2016 (4): pdb.prot087387. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087387>.
- Watanabe, Nobumoto, Harumi Arai, Yoshifumi Nishihara, Makoto Taniguchi, Naoko Watanabe, Tony Hunter, and Hiroyuki Osada. 2004. "M-Phase Kinases Induce Phospho-Dependent Ubiquitination of Somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (13): 4419–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307700101>.
- Weichert, W., A. Roske, S. Niesporek, A. Noske, A.-C. Buckendahl, M. Dietel, V. Gekeler, M. Boehm, T. Beckers, and C. Denkert. 2008. "Class I Histone Deacetylase Expression Has Independent Prognostic Impact in Human Colorectal Cancer: Specific Role of Class I Histone Deacetylases In Vitro and In Vivo." *Clinical Cancer Research* 14 (6): 1669–77. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0990>.
- Weichert, Wilko. 2009. "HDAC Expression and Clinical Prognosis in Human Malignancies." *Cancer Letters*, HDAC Inhibitors for the Treatment of Cancer, 280 (2): 168–76. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.10.047>.

- Willis, S. N. 2005. "Proapoptotic Bak Is Sequestered by Mcl-1 and Bcl-XL, but Not Bcl-2, until Displaced by BH3-Only Proteins." *Genes & Development* 19 (11): 1294–1305. <https://doi.org/10.1101/gad.1304105>.
- Wilson, Andrew J., Do-Sun Byun, Natalia Popova, Lucas B. Murray, Kaitlin L'Italien, Yoshihiro Sowa, Diego Arango, Anna Velcich, Leonard H. Augenlicht, and John M. Mariadason. 2006. "Histone Deacetylase 3 (HDAC3) and Other Class I HDACs Regulate Colon Cell Maturation and P21 Expression and Are Deregulated in Human Colon Cancer \*." *Journal of Biological Chemistry* 281 (19): 13548–58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510023200>.
- Witt, Olaf, Hedwig E. Deubzer, Till Milde, and Ina Oehme. 2009. "HDAC Family: What Are the Cancer Relevant Targets?" *Cancer Letters* 277 (1): 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.08.016>.
- Xiong, Yue, Gregory J. Hannon, Hui Zhang, David Casso, Ryuji Kobayashi, and David Beach. 1993. "P21 Is a Universal Inhibitor of Cyclin Kinases." *Nature* 366 (6456): 701–4. <https://doi.org/10.1038/366701a0>.
- Xu, W. S., R. B. Parmigiani, and P. A. Marks. 2007. "Histone Deacetylase Inhibitors: Molecular Mechanisms of Action." *Oncogene* 26 (37): 5541–52. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210620>.
- Yin, Yuping, Qian Shen, Ruikang Tao, Weilong Chang, Ruidong Li, Gengchen Xie, Weizhen Liu, Peng Zhang, and Kaixiong Tao. 2018. "Wee1 Inhibition Can Suppress Tumor Proliferation and Sensitize P53 Mutant Colonic Cancer Cells to the Anticancer Effect of Irinotecan." *Molecular Medicine Reports* 17 (2): 3344–49. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8230>.
- Zeman, Michelle K., and Karlene A. Cimprich. 2014. "Causes and Consequences of Replication Stress." *Nature Cell Biology* 16 (1): 2–9. <https://doi.org/10.1038/ncb2897>.
- Zeng, Yan, Kristi Chrispell Forbes, Zhiqi Wu, Sergio Moreno, Helen Piwnicka-Worms, and Tamar Enoch. 1998. "Replication Checkpoint Requires Phosphorylation of the Phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1." *Nature* 395 (6701): 507–10. <https://doi.org/10.1038/26766>.
- Zhang, Zhenhuan, Hiroko Yamashita, Tatsuya Toyama, Hiroshi Sugiura, Yoko Omoto, Yoshiaki Ando, Keiko Mita, Maho Hamaguchi, Shin-Ichi Hayashi, and Hirotaka Iwase. 2004. "HDAC6 Expression Is Correlated with Better Survival in Breast Cancer." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 10 (20): 6962–68. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0455>.
- Zhao, Ming, Lopa Mishra, and Chu-Xia Deng. 2018. "The Role of TGF- $\beta$ /SMAD4 Signaling in Cancer." *International Journal of Biological Sciences* 14 (2): 111–23. <https://doi.org/10.7150/ijbs.23230>.
- Zheng, Minhua, Hao Wang, Haobo Zhang, Qishi Ou, Baihua Shen, Ningli Li, and Baoming Yu. 1999. "The Influence of the P53 Gene on the in Vitro Chemosensitivity of Colorectal Cancer Cells." *Journal of Cancer Research*

*and Clinical Oncology* 125 (6): 357–60.  
<https://doi.org/10.1007/s004320050286>.

## 8. Danksagung

---

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei all jenen bedanken, die mich während meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

An erster Stelle geht hierbei mein Dank an [REDACTED], der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir die Möglichkeit gab, Einblicke in die wissenschaftliche Forschung zu sammeln und die Promotion im Bereich der Toxikologie zu erlangen. Ferner möchte ich ihn für seine tatkräftige Unterstützung und sein Vertrauen danken.

[REDACTED] gilt ebenfalls mein herzlichster Dank, für das Erstellen des Zweitgutachten meiner Dissertation.

Ein besonders großes Dankeschön auch an meine Betreuerin [REDACTED], die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und immer ein offenes Ohr für Fragen und Probleme hatte. Vielen Dank auch für das aufmerksame Korrekturlesen und das Informieren über aktuelle und hilfreiche Publikationen während der Fertigstellung meiner Dissertation.

Des weiteren bedanke ich mich herzlich bei der Arbeitsgruppe [REDACTED] für ihre freundliche Unterstützung und das herzliche Arbeitsklima im Labor!

Zuletzt möchte ich mich noch außerordentlich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich stets motiviert haben weiterzumachen und für wunderschöne Pausenmomente während den langen Stunden in der Bibliothek gesorgt haben. Außerdem möchte ich Ihnen für den unverzichtbaren IT-Support danken.

## 9. Curriculum Vitae

---

### Persönliche Informationen

Name: Irene Mengchu Hauzenberger  
Geburtstag: [REDACTED]  
Geburtsort: [REDACTED]  
Nationalität: [REDACTED]  
Adresse: [REDACTED]  
Telefonnummer: [REDACTED]  
E-mail: [REDACTED]

### Ausbildung

15.11.2021  
10.2014 – 11.2021  
**Erhalt der Approbation als Ärztin**  
**Humanmedizinstudium an der Universitätsmedizin Mainz**

- 11.2021 3. Staatsexamen
- 11.2020 – 10.2021 Praktisches Jahr
- 10.2020 2. Staatsexamen
- 03.2017 1. Staatsexamen

09.2018 – 06.2022  
**Promotion am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universitätsmedizin Mainz**

- Thema „*Modulation der replikativen Stressantwort durch Kombinationstherapien mit Entinostat in Kolonkarzinomzellen*“  
Betreuung durch Prof. O. Krämer
- Publikationsbeteiligung „*Mechanistic insights into p53-regulated cytotoxicity of combined entinostat and irinotecan against colorectal cancer cells*“ Marx et al. 2021

07.2014  
**Matura mit Auszeichnung am [REDACTED]**

### Klinische Erfahrung

11.2020 – 10.2021  
**Praktisches Jahr**

- 3. Tertial: Innere Medizin; Asana Spital Menziken, Schweiz
- 2. Tertial: Chirurgie; Universitätsmedizin Mainz, Deutschland
- 1. Tertial: Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerzmedizin; Barmherzige Brüder Krankenhaus Wien, Österreich

10.2020  
**Zusatzfamulatur (2-wöchig)** in der Abteilung für Urologie und Andrologie, Klinikum Klagenfurt am Wörthersee

- 2017 – 2019      **Pflichtfamulaturen (30-tägig)**
- Allgemein- und Viszeralchirurgie; El Pino Hospital de Santiago de Chile über das IFMSA SCOPE-Austauschprogramm
  - Allgemeinmedizin; Praxis Dr. Bächler, Bad Kreuznach
  - Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde; LKH-Universitätsklinikum Graz
  - Angiologie; Universitätsmedizin Mainz
- 2014 – 2016      **Pflegepraktikum (30-tägig)**
- Augenheilkunde; Universitätsmedizin Mainz
  - Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie; Tongji University People's First Hospital Shanghai
  - Orthopädie und Unfallchirurgie, Universitätsmedizin Mainz

#### Nebenerwerbstätigkeiten

- 2017 - 2020      **Wissenschaftliche Hilfskraft** im Studienzentrum der Angiologie an der Universitätsmedizin Mainz
- 2016 – 2017      **Tutorin** im anatomischen Präparierkurs des Funktionell Klinischen Instituts für Anatomie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

#### Weitere Kenntnisse und Interessen

- Sprachkenntnisse:      Deutsch, Chinesisch (Muttersprachen)  
 Englisch: *Cambridge First Certificate, DAAD Sprachzertifikat (Niveau C1)*  
 Spanisch: *DAAD Sprachzertifikat (Niveau B2)*  
 Französisch: 7 Jahre Schulausbildung (Abschluss 1,0)
- Computer Kenntnisse: *European Computer Driving License Core Certificate*  
 MS Office, Libreoffice, Linux
- Klinische Zertifikate: *ICH Good Clinical Practice*  
*Rave 5.6 EDC Essentials for Clinical Research Coordinators*
- 2017 - 2020      Tätigkeiten als Local Exchange Officer in der AG Austausch der Bundesvertretung der Medizinstudierenden Deutschlands (bvmd)
- seit 2004      Segeln; Mitglied beim Nautic Club Austria (NCA), Teilnahme an Ausbildungstörns des Unisegeln Mainz Sportvereins und NCAs (*2010 A-Schein, 2012 International Certificate of Competence, 2018 SBF See Schein, UBI, SRC, 2019 Sportküstenschifferschein*)
- 2005 – 2013      Klavierausbildung am Johann-Joseph-Fux-Konservatorium Graz