

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

Bedeutung der Survivin-Zellokalisation für die Antwort von Zellen des kolorektalen
Karzinoms auf Topoisomerase I hemmende Zytostatika

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von

Sabrina-Nathalie Reitz
aus Offenbach am Main

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 06.12.2022

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis.....	X
1 Einleitung / Ziel der Dissertation.....	1
1.1 Das Kolorektale Karzinom.....	1
1.1.1 Entstehung, Diagnostik und Therapie.....	2
1.2 Apoptose	5
1.2.1 Initiation über den intrinsischen Weg.....	6
1.2.2 Initiation über den extrinsischen Weg.....	6
1.2.3 Exekution, Phagozytose und Degradation.....	7
1.2.4 “Inhibitors of Apoptosis”	8
1.3 Zellzyklus	13
1.3.1 Die Phasen des Zellzyklus.....	13
1.4 Topoisomerase- Inhibitoren.....	15
1.4.1 Irinotecan.....	17
1.5 DNA-Schadenssignalisierung und Kontrollpunkte	18
1.5.1 p53 - Aktivierung.....	18
1.5.2 Poly- (ADP-Ribose) - Polymerase 1	18
1.6 DNA- Reparaturmechanismen	18
1.6.1 Fehlpaarungsreparatur	21
1.6.2 Homologe Rekombination	23
2 Literaturdiskussion	26
2.1 Literaturübersicht	26
3 Material	28
3.1 Chemikalien und Reagenzien	28

3.2	Puffer und Lösungen	30
3.2.1	Zelllinien und Zellklone	32
3.3	Antikörper.....	34
3.3.1	Primärantikörper	34
3.3.2	Sekundärantikörper	36
3.4	Reaktionskits.....	37
3.5	Primer.....	37
3.6	Zytostatikum.....	39
3.7	Hilfsmittel.....	40
3.7.1	Materialien	40
3.8	Geräte	41
3.9	Software	43
4	Methoden	44
4.1	Zellkultur.....	44
4.1.1	Kultivierung, Expansion und Lagerung	44
4.1.2	Kultivierung und Aussaat der Zellen	45
4.1.3	Irinotecan-Behandlung.....	46
4.2	Durchflusszytometrie.....	47
4.3	Koloniebildungsassay.....	47
4.4	Proteinanalyse	48
4.4.1	Blaue Extrakte – Zellyse	48
4.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay.....	49
4.4.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
4.4.4	Immunblotting	53
4.4.5	Proteindetektion.....	54
4.4.6	Stripping	55
4.5	DNA.....	56

4.5.1	DNA - Fiber Spreading Assay.....	56
4.6	Transkriptomanalyse.....	61
5	Ergebnisse.....	64
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	64
5.1.1	Koloniebildung.....	65
5.1.2	Induktion des Zelltodes und der Zellzyklus.....	67
5.1.3	Ermittlung der transkriptionellen Aktivität rekombinanter Klone.....	71
5.1.4	Charakterisierung rekombinanter Zellklone.....	75
5.1.5	Exprimierung des Fusionsprotein.....	76
5.1.6	Untersuchung der DNA-schadenabhängigen Antwort.....	77
5.1.7	Untersuchung der Replikationsprogression.....	82
6	Diskussion.....	88
6.1	Diskussion der Ergebnisse.....	88
6.1.1	Koloniebildung, Zelltod und Zellzyklusverteilung.....	88
6.1.2	Ergebnisse der DNA-schadensabhängigen Antwort.....	89
6.1.3	Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivität.....	91
6.1.4	DNA-Fiber Assay.....	91
7	Zusammenfassung.....	96
8	Literaturverzeichnis.....	100
	Anhang.....	IV
	Danksagung.....	XVIII
9	Lebenslauf.....	XIX

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ Gramm)
µl	Mikroliter (10 ⁻⁶ Liter)
µm	Mikrometer (10 ⁻⁶ Meter)
µM	Mikromol/mikromolar (10 ⁻⁶ Mol)
A	Ampère
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APAF-1	<i>apoptosis protease activating factor 1</i>
APS	Ammonium Persulfat
Artemis	DNA Cross-Link Repair 1C
ATF	Aktivierende Transkriptionsfaktor
ATM-Weg	Ataxia teleangiectasia mutated / Rad3 related
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl-2-assoziiertes Protein
Bcl-2	B-Zell-Lymphom-Protein 2 / Apoptoseregler Bcl-2
Bcl-xL	BCL-2-verwandtes Protein
Bid	BH3 Interaktionsdomänen-Todesagonisten
BIR	Baculovirus IAP repeat Domäne
BRCA1	Brustkrebs - Gen 1
BRCA2	Brustkrebs - Gen 2
BSA	Bovines Serumalbumin
CARD's	Caspase Rekrutierungsdomäne
Caspase	Cysteinyl-Aspartat spezifische-Protease
CDK's	Cyclin-abhängige Kinasen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
c-Flip	Flice-inhibitorisches Protein
clAP1	<i>cellular Inhibitor of apoptosis protein 1</i>
clAP2	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein 2</i>
CldU	5-Chlor-2-Desoxyuridin

cm	Zentimeter
con	Kontrolle
CPC	Chromosomal Passenger Complex
CPT-11	Irinotecan
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
CRM 1	Chromosomal Region Maintenance 1
d	Tage
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Desoxynukleosid-Triphosphat
DSBs	DNA-Doppelstrangbrüche (DNA double-strand breaks)
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
EXO1	Exonuclease 1
F	5-Fluoruracil
Fa.	Firma
FACS	fluorescence-activated-cell-sorting
FADD	Fas-assoziierte Todesdomäne
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FasL	Fas-Ligand
FasR	Fas-Rezeptor
FCS	Fötales Kälberserum
FEN 1	Flap Endonuklease 1
FOL	Folsäure
g	Gramm
G ₁	„Gap“ -Phase 1
G ₁ /S	Übergang von der „Gap“-Phase 1 in die S-Phase
G ₂	„Gap“ -Phase 2
G ₂ /M	Übergang von der „Gap“-Phase 2 in die Mitose
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

h	Stunde
HCl	Salzsäure
HNPCC	Hereditäres kolorektales Karzinom ohne Polyposis/ Lynch-Syndrom
HR	Homologe Rekombination
HSP	Hitzeschockprotein
I	Irinotecan
IR	Ionisierende Strahlung
IAPs	<i>Inhibitor-of-Apoptosis proteins</i>
IdU	5-Iod-2-Desoxyuridin
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
ILP 2	Inhibitor of apoptosis protein like 2
INCENP	inneres Zentromerprotein
KRK	Kolorektales Karzinom
l	Liter
LL	Leitlinie
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
M	Mol
mA	Milliampère (10^{-3} Ampère)
mAb	monoklonaler Antikörper
MeOH	Methanol
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
ML-IAP	melanoma inhibitor protein
MPF	maturation promoting factor
min	Minute, Minuten
MMR	DNA-Fehlpaarungsreparatur (mismatch repair)
MRN	MRE-11-Rad50-NBS1-Komplex
mRNA	messenger RNA
MSH 2	mutS homolog 2
MSH 6	mutS homolog 6
MSI-L	Mikrosatelliten
MSS	mikrosatellitenstabil

NAIP	neuronal apoptosis inhibitor protein
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NES	nukleärer Export Signal
NHES	non homolog endjoining
NOXA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat-induziertes Protein 1
P21	CDK-Inhibitor 1
p53	p53-Protein
PARP 1	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	Phosphate-buffered-saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PI	Propiumiodid
PUMA	P53 Upregulated Modulator of Apoptosis
POL	Polymerase
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMAC	zweiter mitochondrialer Aktivator der Caspase
SN-38	7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin
S-Phase	Synthesephase im Zellzyklus
SSBs	DNA-Einzelstrangbrüche (DNA single-strand breaks)
tBid	gekürztes Bid-Protein (tranced Bid)
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris-buffered saline)
TBST	Tris(hydroxymethyl)aminomethan- buffered- saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor Alpha
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
TOP-I	Topoisomeraseinhibitor-I
TOP-II	Topoisomeraseinhibitor-II
TRADD	TNF-assoziierte Todesdomäne (TNF α -associated death domain)

TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UICC	Union Internationale contre le cancer
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp
VEGF	vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Chemikalien und Reagenzien	28
Tabelle 2 Puffer und Lösungen	30
Tabelle 3 Zellstämme und Zellklone	32
Tabelle 4 Primärantikörper	34
Tabelle 5 Primärantikörper	36
Tabelle 6 Sekundärantikörper	36
Tabelle 7 Sekundärantikörper	36
Tabelle 8 Reaktionskits	37
Tabelle 9 Sequenzierungsprimer	37
Tabelle 10 Zytostatikum	39
Tabelle 11 Materialien	40
Tabelle 12 Geräte	41
Tabelle 13 Software	43
Tabelle 14 Medium und Komponenten für die Zellkultur	44
Tabelle 15 Antibiotikum	45
Tabelle 16 Irinotecan-Behandlungsmenge.	46
Tabelle 17 Aussaat Blaue Extrakte SW48	48
Tabelle 18 Aussaat Blaue Extrakte SW48 Surv.GFP C3	48
Tabelle 19 Aussaat Blaue Extrakte SW48 Surv.NESmut S6	49
Tabelle 20 SDS-Page Trenngel und Sammelgel	50
Tabelle 21 DNA-Faserspurtypen	60
Tabelle 22 cDNA-Synthese	63
Tabelle 23 Real-Time qPCR	63
Anhang 1: Tabelle 24 TNM-Klassifikation des kolorektales Karzinoms	IV
Anhang 2: Tabelle 25 UICC-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms	V

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Verteilung des kolorektalen Karzinom (KRK)	1
Abbildung 2 Relative Überlebensrate nach Erkrankung mit Kolorektalem Karzinom	2
Abbildung 3 Die vier Phasen der Apoptose	5
Abbildung 4 Apoptose	8
Abbildung 5 Schematische Darstellung der IAP-Proteine	9
Abbildung 6 Survivin	11
Abbildung 7 Zellzyklus	13
Abbildung 8 Wirkmechanismus der Topoisomerase-Inhibitoren	16
Abbildung 9 Umwandlung von Irinotecan (CPT-11) zu SN-38	17
Abbildung 10 Transkriptionelle Faktoren und dessen Signalgebung	20
Abbildung 11 Fehlpaarungsreparatur	22
Abbildung 12 Homologe Rekombination	24
Abbildung 13 Nicht- Homologe Rekombination	25
Abbildung 14 Parentale Zelllinie SW48	33
Abbildung 15 Klonogene Zelllinie SurvGFP C3	33
Abbildung 16 Klonogene Zelllinie SurvNESmut S6	33
Abbildung 17 Western Blot	52
Abbildung 18 DNA-Labeling	56
Abbildung 19 DNA-Faseranalyse	60
Abbildung 20 Polymerase-Kettenreaktion	61
Abbildung 21 Colony forming assay	65
Abbildung 22 Durchflusszytometrische Analyse SW48	68
Abbildung 23 Durchflusszytometrische Analyse Surv.GFP C3	69
Abbildung 24 Durchflusszytometrische Analyse Surv.NESmut S6	70
Abbildung 25 qPCR-Analyse spezifischer Genaktivität SW48	72
Abbildung 26 qPCR-Analyse spezifischer Genaktivität Surv.GFP C3	73
Abbildung 27 qPCR-Analyse spezifischer Genaktivität Surv.NESmut S6	74
Abbildung 28 Western Blot Analyse "Verifizierung des Zellmodells"	75
Abbildung 29 Immunfluoreszenz	76
Abbildung 30 Western Blot Analyse 24h und 48h	78
Abbildung 31 Western Blot Analyse 72h und 96h	79
Abbildung 32 Western Blot Analyse 72h und 96h Pro-/Antiapoptotische Marker	81
	X

Abbildung 33 DNA-Faseranalyse SW48	84
Abbildung 34 DNA-Faseranalyse SW48 2.5 μ M IT nach 24h	85
Abbildung 35 DNA-Faseranalyse Surv.GFP C3 2.5 μ M IT nach 24h	86
Abbildung 36 DNA-Faseranalyse NESmut S6 2.5 μ M IT nach 24h	87
Anhang 3: Abbildung 37 Colony formation assay	VI
Anhang 4: Abbildung 38 Durchflusszytometrische Histogramme SW48	VII
Anhang 5: Abbildung 39 Durchflusszytometrische Histogramme Surv.GFP C3	X
Anhang 6: Abbildung 40 Durchflusszytometrische Histogramme Surv.NESmut S6	XIV
Formel 1 Zellzahlbestimmung	46
Formel 2 Irinotecan-Behandlung	46

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

1.1 Das Kolorektale Karzinom

Das Kolorektale Karzinom (KRK) zählt zu den häufigsten Krebserkrankungen und ist die zweithäufigste Todesursache als Folge maligner Tumore in Deutschland (Renehan et al., 2002). Epidemiologisch betrifft jede achte Krebserkrankung den Dickdarm oder den Enddarm, zwei Drittel aller Tumore wurden alleinig im Kolon diagnostiziert. In 75 – 80 % der Fälle ist das KRK im linken Kolon lokalisiert (Karzinome, 2017, Geißler and Graeven, 2005).

Jährlich erkranken 81 von 100 000 Menschen an KRK wobei das Risiko mit zunehmendem Alter steigt (Schmoll, 2007). Darüber hinaus wird das Karzinomrisiko durch das Rauchen um den Faktor 2-3 erhöht. Zu den weiteren Risikofaktoren zählen genetische Prädisposition, chronisch entzündliche Darmerkrankungen (*Colitis ulcerosa*, *Morbus Crohn*), familiäre Syndrome wie das Lynch-Syndrom bzw. hereditäres, nicht polypöses Kolonkarzinom (HNPCC) sowie familiäre adenomatöse Polyposis (FAP). Auch ballaststoffarme Ernährung und erhöhter Fett- und Fleischkonsum führen zu einem höheren Risiko, an einem KRK zu erkranken (Herold, 2020, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. , 2015/2016).

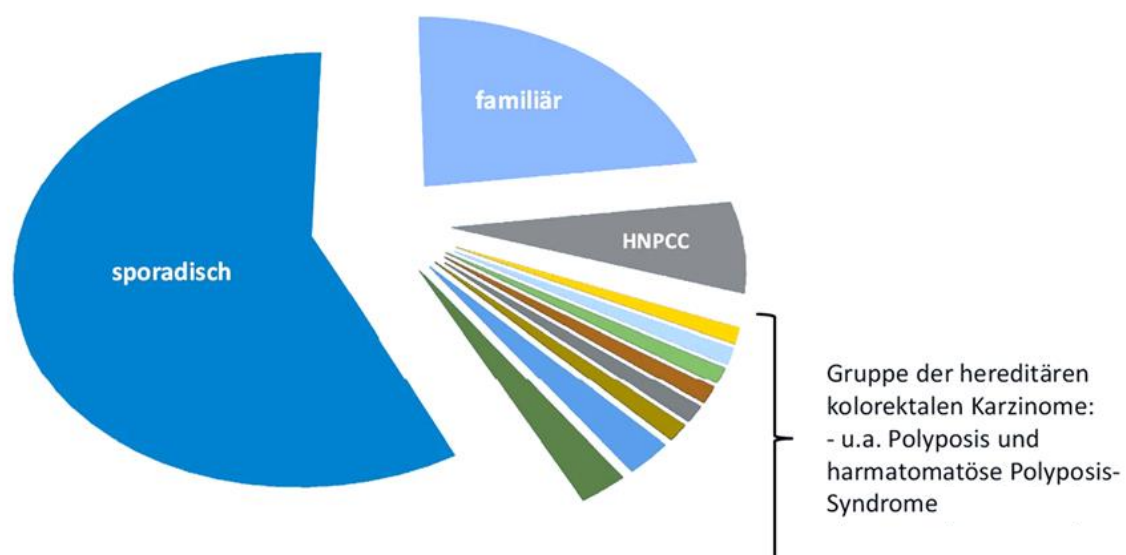


Abbildung 1 Verteilung des kolorektalen Karzinom (KRK)
(Nöpel-Dünnebacke et al., 2021)

1.1.1 Entstehung, Diagnostik und Therapie

In mehr als 90 % der Fälle entsteht ein KRK aus sogenannten Adenomen. Adenome sind gutartige Tumore, die sich zu malignen Tumoren manifestieren können. Mithilfe des Tumorprogressionsmodells nach Vogelstein und Fearon konnten involvierte molekularbiologische Veränderungen nachgewiesen werden. Das Modell veranschaulicht, dass in diesem Prozess eine bestimmte Adenom-Karzinom-Sequenz für die Entstehung eines Karzinoms wesentlich ist. Des Weiteren können Adenokarzinome über einen serratierten Karzinogeneseweg entstehen (Institut für Pathologie, 2021).

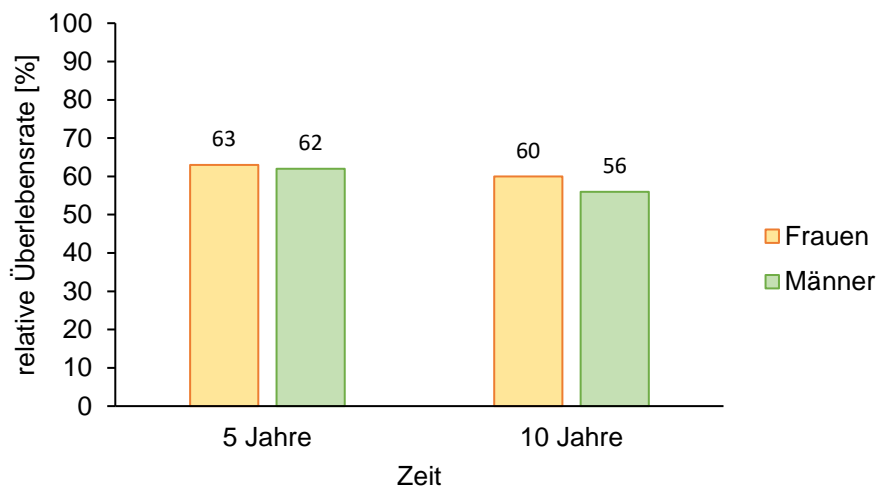


Abbildung 2 **Relative Überlebensrate nach Erkrankung mit Kolorektalem Karzinom**
Alle Daten sind auf je 100.000 Personen evaluiert und altersstandardisiert nach altem Europastandard (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2015/2016).

Ausgehend von der „Union Internationale Contre le Cancer“ wird die Klassifizierung kolorektaler Karzinome anhand der UICC-Stadieneinteilung vorgenommen (siehe Anhang 1: Tabelle 24 und Anhang 2: Tabelle 25). Diese dient als Grundlage für die Therapie und deren Prognose (Schmiegel et al., 2004).

Die Erhebung der allgemeinen Anamnese und die entsprechende Familienanamnese sind äußerst relevant, da hierbei Zusammenhänge im Hinblick auf die Erkrankung des hereditären non-polypösen Kolonkarzinom (HNPCC/Lynch-Syndrom) gefunden werden können. Das Basis-*Staging* beim KRK besteht aus dem fäkalen Okkultbluttest, der Sigmoidoskopie und der als Goldstandard bewertenden Methode der Koloskopie

(Schneider and Caspary, 2003). Eine zusätzliche Bildgebung ist bei unklaren Befunden, Metastasen und Infiltrationsverdacht für die Diagnostik empfehlenswert. Mittels einer Abdomensonografie oder einem Röntgen-Thorax können Fernmetastasen diagnostiziert werden.

Für die individuelle Behandlung ist ein interdisziplinäres Tumorboard erforderlich. Hierbei sind folgende Parameter zu berücksichtigen: Der Allgemeinzustand des Patienten, die Lokalisation und die Ausdehnung des Tumors, sowie die Molekularbiologie des Kolorektalen Karzinoms.

Das Therapieregime entscheidet sich anhand der zuvor erfolgten Klassifizierung des KRK's. Laut der S3-Leitlinie des Leitlinienprogramms der Onkologie „Kolorektales Karzinom“ sieht die Erstlinientherapie bei einem metastasierten KRK (Stadium IV nach Dukes) unter anderem folgendes Regime vor: Die FOLFIRI-Therapie ist eine adjuvante Chemotherapie, in der Folsäure (FOL), 5-Fluoruracil (F) und Irinotecan (I) eingesetzt werden (Schmiegel et al., 2004). Die Boluskombination ist hierbei sorgfältig zu kontrollieren und dient in erster Linie rein palliativ. Des Weiteren sorgt die Therapie für eine Verbesserung der Lebensqualität und Verringerung der Beschwerden des Patienten (Höffken et al., 2002; 99).

Die Behandlung mit Irinotecan bringt Nebenwirkungen mit sich und kann eine mit Loperamid behandelbare schwere Diarrhoe nach 3 - 5 Tagen auslösen. Ferner kann es zu akut cholinergen Symptomen kommen, bei denen die Gabe von Atropin sinnvoll ist (V. Heinemann, 2013). Zu den weiteren Nebenwirkungen zählen die asymptomatische hepatische Störung, sowie eine erhöhte hämatologische Toxizität. Außerdem erfolgt der Verlust des Haares innerhalb der ersten drei bis vier Wochen nach Therapiebeginn (Pommier, 2009).

Darüber hinaus können monoklonale Antikörper, die der Steigerung der progressionsfreien Überlebensrate und des Gesamtüberlebens dienen, in der Therapie eingesetzt werden (Cunningham et al., 2013). Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF) bindet und das progressionsfreie Überleben in Kombination mit einer 5-Fluoruracil-basierten Chemotherapie deutlich verbessert (Saltz et al., 2008, Hurwitz et al., 2005). Der Nachweis eines Mikrosattelitenstatus entscheidet über eine optimale Therapie (Kurreck et al., 2021).

Die Nachsorge ist unabhängig vom spezifischen Tumorstadium und beginnt ab dem Zeitpunkt der Operation (Holmer and Kreis, 2017). Unmittelbar nach der Diagnostik und der anschließenden Therapie ist ein engmaschiger Recall nötig. Dieser führt gegen die hohe Prävalenz eines sekundären Karzinoms. Anhand des erhöhten Risikos besteht in den ersten 5 Jahren nach Therapiebeginn eine bis zu 24 % -ige Wahrscheinlichkeit an einem lokalen oder lokoregionären Rezidiv zu erkranken. Wenn der Primärtumor bereits unter Fernmetastasen diagnostiziert wurde, liegt hierbei das erneute Risiko einer Erkrankung bei 25 % oder bei einem metachronen Zweittumor bei 1.5 - 10 % (Schmiegel et al., 2004).

1.2 Apoptose

Apoptose ist eine Form des „programmierten Zelltodes“, ein physiologisch kontrollierter Mechanismus. Die Regulation des Zelltodes ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der Homöostase und die Entwicklung von Organismen (De Almagro and Vucic, 2012). Der Zelltod wird anhand seiner morphologischen oder biochemischen Kriterien unterschieden (Wyllie et al., 1980).

Aufgrund der molekularen Krebspathogenese wirken Tumorarten entgegen der Selbstelimination. Die meisten soliden Tumoren sind im Allgemeinen gegen Chemotherapie-induzierte Apoptose resistent. Hierbei spielen die häufigen Mutationen im Tumorsuppressor-Protein p53 eine überaus besondere Rolle. Dieser Transkriptionsfaktor, der in ca. 50 % der malignen Tumore mutiert vorliegt, führt zum deregulierten Zellwachstum.

Der Weg der Apoptose umfasst biochemisch vier Phasen. Zuerst findet die Initiation statt, gefolgt von der Exekution. Anschließend phagozytieren die Makrophagen die apoptotische Zellen und es kommt schließlich zur Degradation.

Die allgemeine Aktivierung des Zelltodes findet somit über zwei Wege statt. Der Ablauf der Initiation unterscheidet sich zwischen dem intrinsischen und dem extrinsischen Weg.

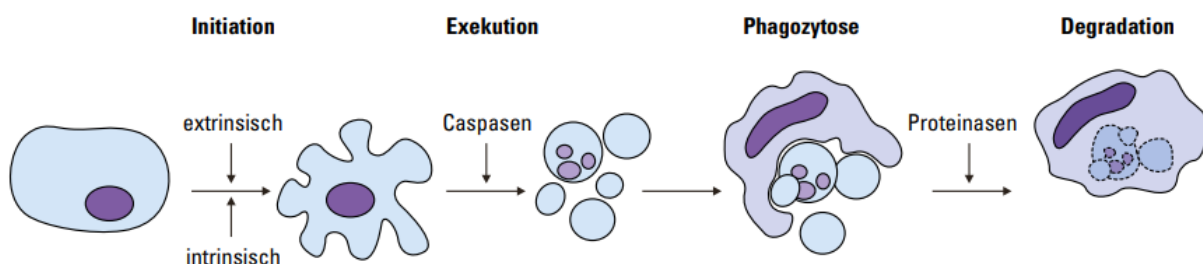


Abbildung 3 **Die vier Phasen der Apoptose**
(Mit freundlicher Genehmigung von Medi-Learn)
(MediLearn, 2018)

1.2.1 Initiation über den intrinsischen Weg

Intrazelluläre Faktoren wie die Permeabilitätserhöhung der äußeren Mitochondrienmembran initiieren den intrinsischen Apoptoseweg (Abbildung 4).

Grundsätzlich kommt es bei der Apoptose zur Expression proapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie. Zur diesen gehören unter anderem *p53 Upregulated Modulator of Apoptosis* (PUMA) und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat-induziertes Protein 1 (NOXA). *In vitro* wurde ersichtlich, dass PUMA eine wichtige Rolle bei der p53-vermittelten Apoptose spielt und dessen Überexpression zur Freisetzung von Cytochrom-C aus den Mitochondrien führt (Liu et al., 2003). Somit vermittelt NOXA, welches mit einigen Mitgliedern der Bcl2-Familie interagiert und im Mitochondrium lokalisiert ist, die p53-induzierte Apoptose (Oda et al., 2000).

In der Bcl-2-Familie ist die Expression von Bax und Bid zu berücksichtigen, welche die Expression von Bcl-2 und dem Bcl-2-verwandten Protein (Bcl-X_L) hemmen. Das zytosolische Bid-Protein wird zu tBid gespalten und an das Mitochondrium weitergeleitet. Anschließend wird die äußere Mitochondrienmembran durch Bax und tBid destabilisiert, wodurch Cytochrom C freigesetzt werden und an den Apoptose-aktivierenden Faktor APAF-1 binden kann. APAF-1 enthält eine zentrale Domäne und hat ein homologes aminoterminal Ende zu den sogenannten Caspase-Rekrutierungsdomänen (CARD's) (Kliche et al., 1999). Nach der Bindung von APAF-1 erfolgt eine Konformationsänderung, bei der durch Proteolyse die Procaspase-9 zur Caspase-9 gespalten und somit aktiviert wird.

1.2.2 Initiation über den extrinsischen Weg

Die wichtigsten Regulatoren des extrinsischen Wegs der Apoptose sind die *Inhibitors of Apoptosis Proteine* (IAPs) (Deveraux and Reed, 1999). Diese können durch direkte Interaktion mit den Caspasen die Apoptose modulieren und inhibieren (Lincz, 1998). Der extrinsische Apoptoseweg wird durch zytotoxische T-Zellen oder über natürliche Killerzellen induziert (Abbildung 4). Mögliche Auslöser können der Mangel an Androgenen oder die Glucocorticoide in den Lymphozyten sein. Weitere begünstigte Faktoren sind Zytokine. Zu diesen gehört der Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- α) aus der Superfamilie der Tumornekrosefaktor-Rezeptorgene, der an Rezeptoren mit einer Todesdomäne bindet und Caspasen aktiviert (Locksley et al., 2001, Elmore, 2007). Die Bindung des TNF-Liganden an den TNF-Rezeptor (TNFR) bringt eine Bindung des

Adapterproteins TRADD unter einer Rekrutierung von FADD und RIP mit sich (Wajant, 2002, Hsu et al., 1995, Elmore, 2007). Anschließend kommt es zur Dimerisierung der Todeseffektordomäne und zur katalytischen Aktivierung von Procaspase-8 wodurch die Apoptose induziert wird (Kischkel et al., 1995).

Eine Inhibition der Todesrezeptor- vermittelten Apoptose kann über das Protein c-Flip erreicht werden. Dieses Protein bindet an das Adapterprotein FADD und an Caspase-8, wobei eine direkte Hemmung erfolgt (Kataoka et al., 1998, Scaffidi et al., 1999, Elmore, 2007).

1.2.3 Exekution, Phagozytose und Degradation

Über den intrinsischen Apoptoseweg wird aktive Caspase-9 gebildet, über den extrinsischen Apoptoseweg aktive Caspase-8. Die Aktivierung von Caspase-8 beziehungsweise Caspase-9 führt anschließend zur Aktivierung einer Effektor-Caspasen-Kaskade an deren Ende die Aktivierung von Endonukleasen steht. Die Endonukleasen aktivieren Proteasen für den Abbau der Kern- und Zytoskelett-Proteine. Im letzten Schritt der Apoptose erfolgt die phagozytäre Aufnahme und der Abbau von apoptotischen Zellen, die durch Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche von Makrophagen erkannt werden können (Fadok et al., 2001). Dieser effiziente Aufnahmeprozess verhindert eine Entzündungsreaktion. Eine Dysregulation der Apoptose kann zu Autoimmunerkrankungen, Neurodegeneration und zum Krebs führen (Elmore, 2007).

Sowohl intrinsischer als auch extrinsischer Apoptoseweg resultieren in der Aktivierung derselben Kaskade. Dies zeigt, dass verschiedenste Moleküle beider Hauptwege sich beeinflussen können (Igney and Krammer, 2002).

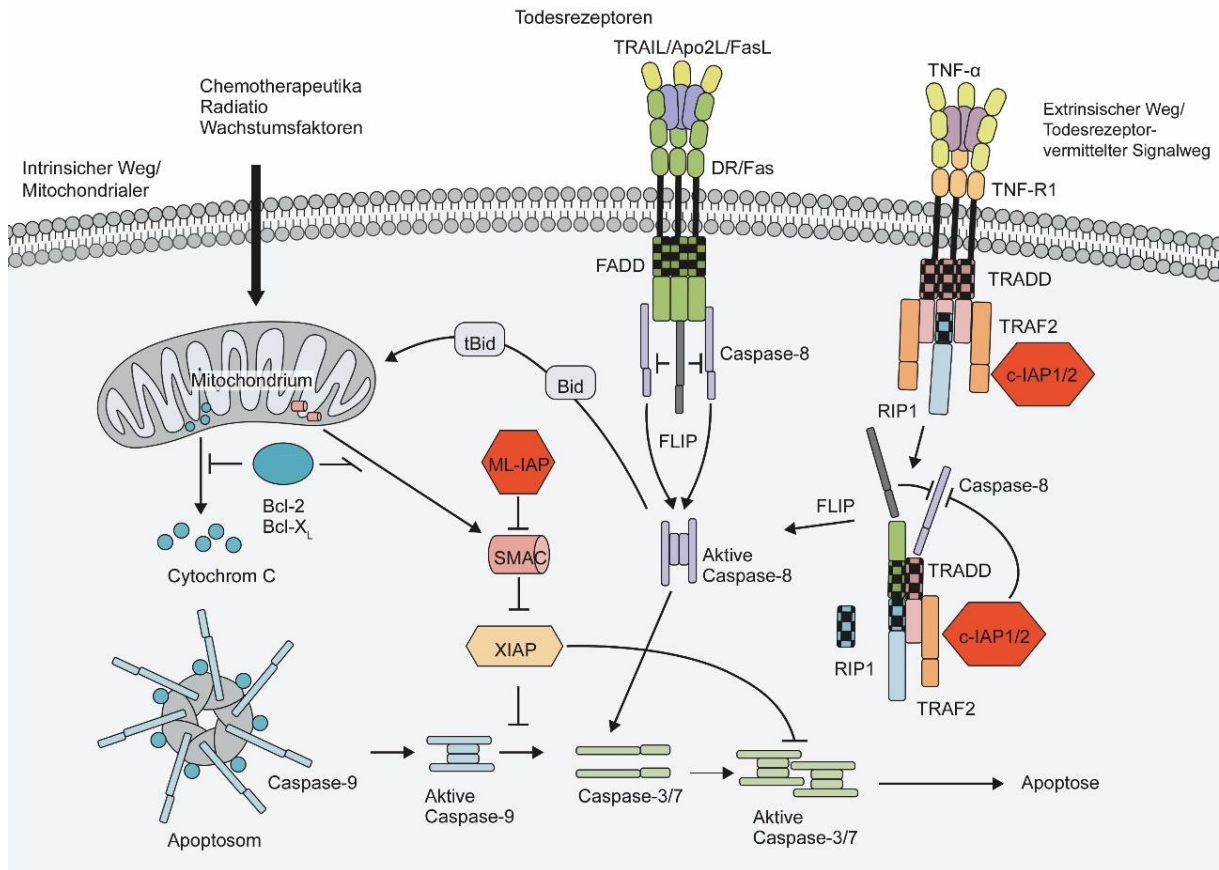


Abbildung 4 **Apoptose**
 Die Wege der intrinsischen und der extrinsischen Apoptose
 (modifiziert nach (De Almagro and Vucic, 2012))

1.2.4 "Inhibitors of Apoptosis"

Die Inhibitoren der Apoptose (IAP)-Proteine sind eine Familie anti-apoptotischer Proteine, die an der Regulation des Zelltods beteiligt sind und somit auch an der Hemmung der Apoptose bis hin zur Regulation des Zellzyklus (De Almagro and Vucic, 2012). Da diese Proteine den Zelltod partiell blockieren können, ermöglichen sie somit auch eine Inhibition der Caspase-Aktivierung (Schimmer, 2004). Auch sind IAPs bei der Chromosomensegregation (Survivin), der allgemeinen zellulären Morphogenese, der Kupfer-Homöostase und dem intrazellulären Signaling involviert (Srinivasula and Ashwell, 2008).

Die apoptotischen Proteine agieren somit als intrinsische Regulatoren der Caspasen-Kaskade und bestehen aus insgesamt acht Proteinen:

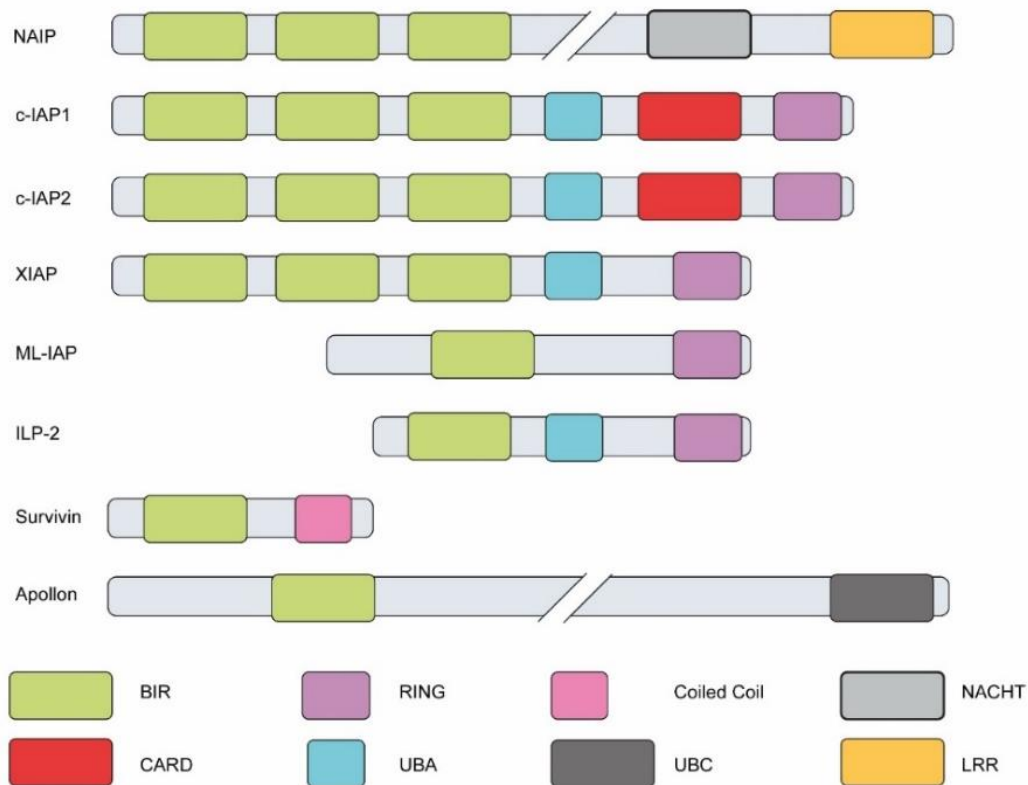


Abbildung 5 **Schematische Darstellung der IAP-Proteine**

(modifiziert nach (De Almagro and Vucic, 2012))

NAIP (neuronal apoptosis inhibitor protein), (Roy et al., 1995)

C-IAP1 (cellular IAP1),

C-IAP2 (cellular IAP2), (Rothe et al., 1995, Duckett et al., 1996, Listen et al., 1996, Uren et al., 1996)

XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein),

(Rothe et al., 1995, Duckett et al., 1996, Listen et al., 1996, Uren et al., 1996),

Survivin (Ambrosini et al., 1998)

Bruce und Apollon (Hauser et al., 1998, Chen et al., 1999)

ML-IAP (melanoma-inhibitor of apoptosis protein),

Livin (Kasof and Gomes, 2001, Vucic et al., 2000)

ILP2 (Inhibitor of apoptosis protein like protein 2).

Die Caspasen werden an Proteine über die BIR (*baculovirus IAP repeat*) Domäne, die als Strukturmerkmal der IAPs gilt (Srinivasula and Ashwell, 2008), oder an CARD (*caspase recruitment domain*), welches in c-IAP1 und c-IAP2 vorhanden ist, gebunden und dementsprechend inhibiert (Deveraux and Reed, 1999). Ein Carboxylterminus-Ring ist an der Bindung von ubiquitinierten Proteinen beteiligt. Das IAP-Protein Survivin enthält keine identifizierbare Proteindomäne, sondern lediglich eine einzelne BIR Domäne und eine Carboxylterminus- α -Helix (Altieri, 2015).

Die IAP-Proteine bieten aufgrund ihrer Fähigkeit, den Zelltod und die erhöhte Expression in einer Vielzahl von Krebszelltypen zu kontrollieren, einen Ansatz für neue Krebstherapien (De Almagro and Vucic, 2012). In der Behandlung von malignen Tumorerkrankungen werden die IAPs in der klinischen Diagnose angewendet. Weitergehend wird hier das IAP-Protein Survivin als diagnostischen Marker für okkulte Malignitäten untersucht (Schimmer, 2004). Für die klinische Relevanz ist unter anderem eine Überexpression einiger Mitglieder der IAP-Familie ausschlaggebend, die zu einer Resistenzvermittlung von Tumoren führt.

1.2.4.1 Survivin und Kern-Zytoplasma-Transport

Survivin gehört zur Familie der IAPs und ist das kleinste Mitglied mit einem Molekulargewicht von 16.5 kDa und 142 Aminosäureresten. Das humane *BIRC5*-Gen welches für Survivin kodiert, ist auf dem Genabschnitt 17q25 lokalisiert. Survivin besitzt eine duale Funktion. Zum einem wirkt Survivin im Zytoplasma der Apoptose entgegen und zum anderen im Kern als Untereinheit des *chromosomal passenger complex* (CPC). Survivin ein wichtiger Regulator der Zellteilung, dementsprechend ein mitotischer Faktor. Hierbei wirkt Survivin als Teil des CPC zusammen mit der mitotischen Kinase Aurora B, Borealin und dem inneren Zentromer Protein (INCENP) (Unruhe et al., 2016)

Für beide Funktionen ist hierbei die Interaktion mit dem Kernexportsignal (*nuclear export signal*, NES) essentiell (Duffy et al., 2007). Survivin ist mit mehreren subzellulären Kompartimenten assoziiert und seine Expression wird durch verschiedene Signalwege reguliert (Altieri, 2003).

Survivin ist ein vielfältiger Faktor, der die Zellteilung, die Apoptose, die Migration und die stressinduzierte Signalübertragung beeinflusst (Altieri, 2015).

Survivin hat eine einzelne BIR - Domäne und keinen RING-Finger, der in einigen anderen IAP-Mitgliedern vorhanden ist. Die letzte Domäne des Proteins wird durch eine amphipathische alpha-helikale Region ersetzt (Duffy et al., 2007).

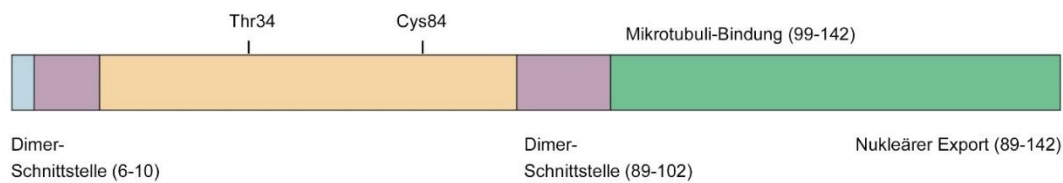


Abbildung 6 Survivin
Struktur-Funktion von Survivin
(Altieri, 2003)

Durch alternatives Spleißen (Splicing) der mRNA können fünf Isoformen des humanen Survivin-Gens synthetisiert werden: Wildtyp-Survivin, Survivin-2B, Survivin- Δ Ex3, Survivin 3B und Survivin 2 α (Duffy et al., 2007, Mahotka et al., 1999, Badran et al., 2004, Caldas et al., 2005).

Die Survivin-Expression ist in differenzierten humanen gesunden Zellen kaum nachweisbar, ist aber in Tumorzellen überexprimiert. In diesem Zusammenhang wurden zellzyklusabhängige Expression während der Mitose nachgewiesen (Altieri, 2003). Da Survivin die Apoptose hemmt, führt eine Überexpression in Tumoren und somit auch bei Darmkrebserkrankungen zu einer kürzeren Überlebensrate (Kawasaki et al., 1998). Dies führt ebenfalls zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Strahlentherapie, und somit zu einer kürzeren Überlebensrate der Patienten. Folglich kann die subzelluläre Lokalisation von Survivin den Krankheitsverlauf und die einhergehende Prognose beeinflussen. Daher wird in der Krebstherapie eine gezielte Survivin-Inhibition angestrebt. Anhand des Survivin-Targetings erfolgt eine induzierte antigenspezifische Immunantwort gegen Survivin-tragende Tumorzellen. Weitere vielversprechende Strategien sind unter anderem die Verwendung von molekularen Antagonisten zur Störung des Survivin-Signalwegs (Altieri, 2003).

1.2.4.2 Kern-Zytoplasma-Transport

Die Beteiligung an der intrazellulären Lokalisation und an der krebsrelevanten Funktion ist für die direkte Interaktion zwischen Survivin mit dem nuklearen Exportrezeptor *Chromosomal Region Maintenance 1* (CRM1) von entscheidender Bedeutung (Stauber et al., 2007).

Der nukleozytoplasmatische Transport findet über den Chromosomen-Passagier-Komplex (CPC) statt, infolgedessen schließt die Signalregulierung und die Rezeptorbindung an. Die Interaktion mit dem Exportrezeptor Crm1 im Zellkern wird über die Kernexportsignale (NES) gesteuert (Weis, 2003, Stauber et al., 2007). Somit ist Survivin als essentielles Mitglied des CPC-Komplexes an der Segregation der in der S-Phase replizierten Chromosomen beteiligt (Knauer et al., 2006, Reich et al., 2021). Neben Exportmechanismen wie dem GTPase Ran-abhängiger Kern-Zytoplasma Transports kann nukleäres Survivin aus dem Zellkern in das Zytoplasma diffundieren (Unruhe et al., 2016).

1.3 Zellzyklus

Einen verbesserten therapeutischen Ansatz der Tumorthherapie bietet die Zellzyklusregulation im Zusammenspiel mit dem programmierten Zelltod. Eine maligne Entartung von Zellen verläuft in mehreren Stufen. Auch das KRK entsteht durch eine Reihe von Mutationen. Eine entscheidende Rolle spielen hierbei Zellregulatoren und Apoptose betreffende genetische Defekte (Royer et al., 1999).

Der Zellzyklus wird durch Cyklin-abhängigen Kinasen (CDKs) reguliert, die durch die mit ihnen assoziierenden Cykline aktiviert werden. CDK- Inhibitoren wie p21 nehmen daher eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus ein, indem sie interne und externe Signale koordinieren und die Proliferation an mehreren wichtigen Kontrollpunkten stören (Johnson and Walker, 1999).

1.3.1 Die Phasen des Zellzyklus

Der Zellzyklus wird in vier Hauptphasen unterteilt: G_1 -, (S)- Synthese, G_2 - und Mitose (M)-Phase (Abbildung 7). Ruhende Zellen befinden sich in der sogenannten G_0 -Phase. Die G_1 -, die S- und die G_2 -Phase bilden die Interphase, in der die DNA-Synthese (Replikation), Proteinbiosynthese und das Zellwachstum ablaufen.

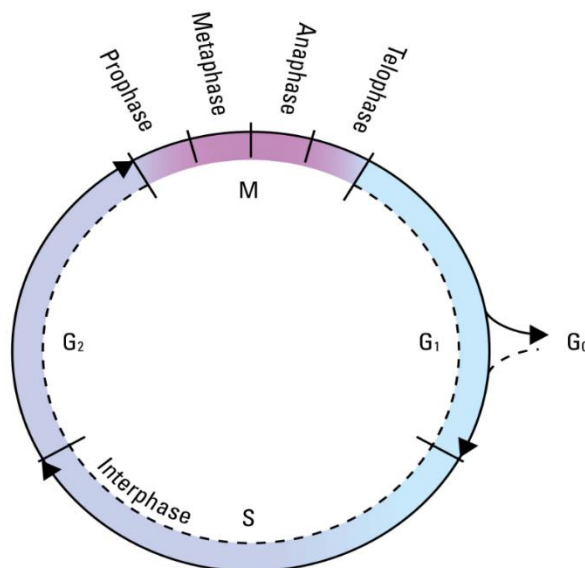


Abbildung 7 **Zellzyklus**
(Mit freundlicher Genehmigung von Medi-Learn)
(MediLearn, 2018)

Während der G₁-Phase finden das Zellwachstum sowie die Synthese von RNA, Proteinen und Enzymen statt. Der Übergang der Zelle aus der G₁-Phase in die S-Phase verläuft über den G₁/S-Kontrollpunkt. Nur funktionsfähige Zellen gelangen in die S-Phase und teilungsunfähige Zellen bzw. Nervenzellen gehen in die G₀-Phase über (MediLearn, 2018). Findet eine Schädigung des Genoms statt, wird der Tumorsuppressor p53 aktiviert und angereichert. Dieser aktiviert den Kinaseinhibitor p21 und hemmt somit die Zellprogression. Dies ermöglicht die Reparatur von DNA-Schäden bevor der Zellzyklus reaktiviert wird. Die Induktion der Apoptose kann hierbei nach Schädigung des Genoms eingeleitet werden. Wird das Protein p53 inaktiviert, kann der Zellzyklus am G₁/S-Kontrollpunkt nicht mehr arretiert werden und Zellen mit nicht reparierten Schäden in der DNA treten in die S-Phase ein. Dies kann zur Bildung von Mutationen und Tumoren beitragen.

In der S-Phase finden die DNA-Replikation und Synthese von Histonen statt. Nach vollständiger Replikation der Chromosomen treten die Zellen in die G₂-Phase ein (MediLearn, 2018).

Die G₂-Phase dient der Qualitätssicherung. Hier werden Replikationsfehler beseitigt und Proteine für die nachfolgende Mitose synthetisiert. Am G₂-Kontrollpunkt ist der Cyklin B/CDK₁-Komplex aktiv. Dieser Komplex wird als *maturation-promoting factor* (MPF) bezeichnet und phosphoryliert Histon H1 und verschiedenste Proteine, die an der Mitose beteiligt sind (Royer et al., 1999). Während der Mitose findet, schließlich die Zellteilung statt. Sie wird morphologisch und funktionell in fünf verschiedene Phasen unterteilt: die Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und die Telophase.

In der Prophase werden die Chromosomen kondensiert, und die Zentriolen beginnen sich zu teilen. Es folgt die Prometaphase, die mit der Auflösung der Kernhülle und der Formation des Spindelapparates einhergeht. Während der anschließenden Metaphase ist der Spindelapparat vollständig ausgebildet und die Chromosomen sind maximal kondensiert und in der Äquatorialebene angeordnet. Am Ende der Metaphase, in der Survivin am Chromosomalen Passagier Komplex (CPC) gebunden ist, wird die Anordnung der Chromosomen kontrolliert (Wheatley and Altieri, 2019).

1.4 Topoisomerase- Inhibitoren

Der molekulare Angriffspunkt in der Krebstherapie sind die menschlichen DNA-Topoisomerasen I (TOP1) und II (TOP2) (Li and Liu, 2001, Pommier, 2006, Pommier, 2009, Nitiss, 2009b, Tomicic and Kaina, 2013, Izumi and Mellon, 2016) (Nitiss, 2009b, Nitiss, 2009a).

Die Topoisomerase I ist an der Entwindung der DNA während der Replikation beteiligt (Saltz et al., 2000, Kawato et al., 1991, Jaxel et al., 1989, Hsiang et al., 1989).

Die hochselektiven Topoisomerase I (TOP1)-Inhibitoren sind Camptothecin-Derivate, die durch eine enzymatische Spaltung zur DNA-Fixierung führen. Während der enzymatischen Spaltung kommt es zur irreversiblen Bindung an die Desoxyribonukleinsäure (DNA), infolgedessen bilden sich TOP spaltbare Komplexe (*TOP1 cleavage complex*, TOP1-cc) (Tomicic and Kaina, 2013). Die DNA-Reparaturmechanismen, die bei der Reparatur von TOP1-cc bzw. der daraus resultierenden DNA-Doppelstrangbrüchen eine Rolle spielen sind weitgehend an den erforscht (Pommier, 2009).

Während des Chromatin-*Remodelling* und der DNA-Reparatur relaxiert die Topoisomerase I die *Supercoilings*, folgend auch vor der Replikation und der Transkription (Wang, 2002, Champoux, 2001, Wang, 1985, Leppard and Champoux, 2005, Tomicic and Kaina, 2013).

Durch das vorübergehende Einbringen von Einzelstrangbrüchen in die DNA-Helix werden die Supercoils entfernt und durch eine kovalente Bindung im katalytischen Zentrum von TOP1 entstehen folgend DNA-Einzelstrangbrüche. Diese TOP1-gespaltenen Zwischenprodukte werden als spaltbare TOP1-cc Komplexe bezeichnet (Tomicic and Kaina, 2013).

Durch die Stabilisierung des Reaktionszwischenprodukts entstehen DNA-Spaltungsstellen, diese scheinen für die Zytotoxizität der Krebsmedikamente verantwortlich zu sein. Durch Veränderung der Replikation und der genomischen DNA-Rekombination kann der TOP1-cc Komplex für den Zelltod ausschlaggebend sein.

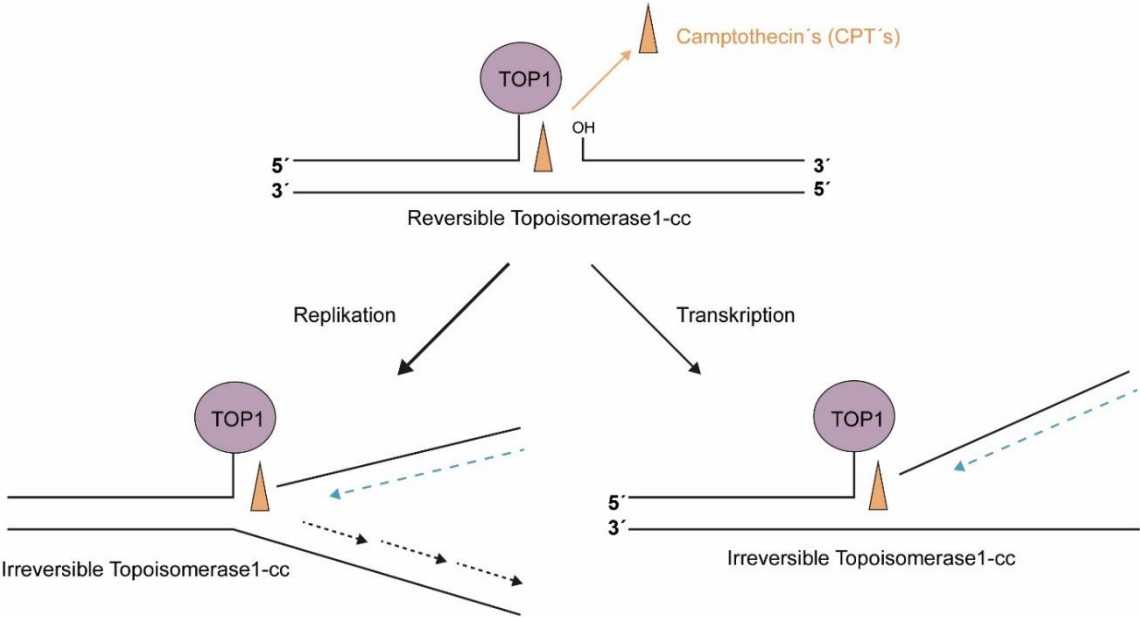


Abbildung 8 Wirkmechanismus der Topoisomerase-Inhibitoren
Die Hemmung der Religationsfunktion des Enzyms führt zur Stabilisierung des TOP1-spaltbaren Komplexes (TOP1-cc), dies führt zur Replikation und zum Stoppen der Transkription. Es erfolgt eine Induktion von RNA- Einzelstrangbrüchen (SSBs) und DNA- Doppelstrangbrüchen (DSBs).
(nach (Tomicic and Kaina, 2013))

1.4.1 Irinotecan

Irinotecan (CPT-11) ist ein *Prodrug* und wird durch die zelluläre Carboxylesterase zu seinem aktiven Metaboliten 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) gespalten. SN-38 hat gegenüber Irinotecan eine 1000-fach höhere Aktivität als CPT-11.

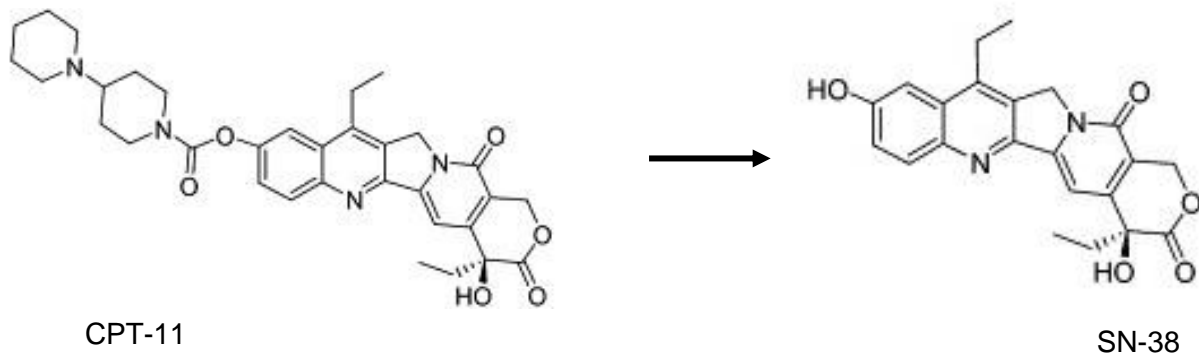


Abbildung 9 **Umwandlung von Irinotecan (CPT-11) zu SN-38**
(Thomas et al., 2004)

Die Induktion von Doppelstrangbrüchen ist hierbei ein replikationsbedingter Schaden, der bei geringen Camptothecin (CPT)-Konzentrationen auf stark proliferierenden Zellen, sowie Tumorzellen zurückzuführen ist (Holm et al., 1989, Tomicic and Kaina, 2013).

Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die replikationsvermittelte Konversion ausgehend vom TOP1-cc Komplex hinzu den Doppelstrangbrüchen, bereits bei einem pharmakologisch niedrigen Wirkstoffkonzentrationsspiegel von Irinotecan eine zielgerichtete Toxizität auf stark proliferierende Krebszellen auf (Tomicic and Kaina, 2013).

1.5 DNA-Schadenssignalisierung und Kontrollpunkte

Die DNA-Schadensregulierung (DNA-Schadensabhängige Antwort, *DNA damage response*, DDR) erfolgt anhand posttranslationaler Modifikationen wie Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, sowie durch die Kontrolle von Histonmodifikationen. An dieser Schadensreaktion sind mehrere Proteine beteiligt, unter anderem Ataxia teleangiectasia mutated (ATM), Rad3 related (ATR) und Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1), sowie wichtige Transkriptionsfaktoren (Christmann et al., 2003).

1.5.1 p53 - Aktivierung

Tumorsuppressor-Protein p53 ist ein sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor, der als Folge des genotoxischen Stresses über einen DNA-Replikationsstopp aktiviert wird. Infolgedessen wird die nukleäre Translokation von p53, die DNA-Bindungsaktivität und die zelluläre p53-Menge erhöht (Christmann and Kaina, 2013).

1.5.2 Poly- (ADP-Ribose) - Polymerase 1 (PARP)

Das DNA-Reparaturenzym PARP-1 ist in den kolorektalen Karzinomzellen weitgehendst überexprimiert. Das Enzym erkennt DNA-Brüche und ist an der Regulierung der Basenexzision beteiligt. PARP-1 kann außerdem die inflammatorische Wirkung vom Kolorektalen Karzinom stimulieren und somit den Transkriptionsfaktor NF- κ B verstärken. Somit ist PARP-1 einerseits an der Tumorprogression, sowie an der Stimulierung der Entzündungsprozesse und andererseits an der Inhibition der Tumorentstehung anhand von DNA-Reparaturmechanismen beteiligt (Dörsam et al., 2018).

1.6 DNA- Reparaturmechanismen

Das Genom steht unter ständiger Kontrolle durch DNA-Reparaturmechanismen. Finden Defekte in dem DNA-Reparaturmechanismus statt, können diese zur Akkumulation, Sensitivierung und Mutation der DNA führen. Hierbei entstehen Karzinome und Störungen im menschlichen Metabolismus (Christmann et al., 2003).

Zu den riskantesten DNA-Schäden gehören die DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs), die unter anderem durch ionisierende Strahlung oder durch sauerstoffreaktive Spezies entstehen können. Die Erhaltung der genomischen Stabilität setzt eine sofortige DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur voraus (Moskwa, 2016).

Die DNA-Reparaturmechanismen können in die Basenexzisionsreparatur (BER), Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und die Fehlpaarungsreparatur (MMR), *Direct Damage Reversal* und DNA-Doppelstrangbruchreparatur unterteilt werden (Wood et al., 2001, Christmann et al., 2003). Da die MMR und die DSB-Reparatur eine entscheidende Rolle für die Resistenz von KRK gegenüber Zytostatika, insbesondere den TOP1-Inhibitoren spielen, werde ich diese zwei Reparaturwege näher beschreiben.

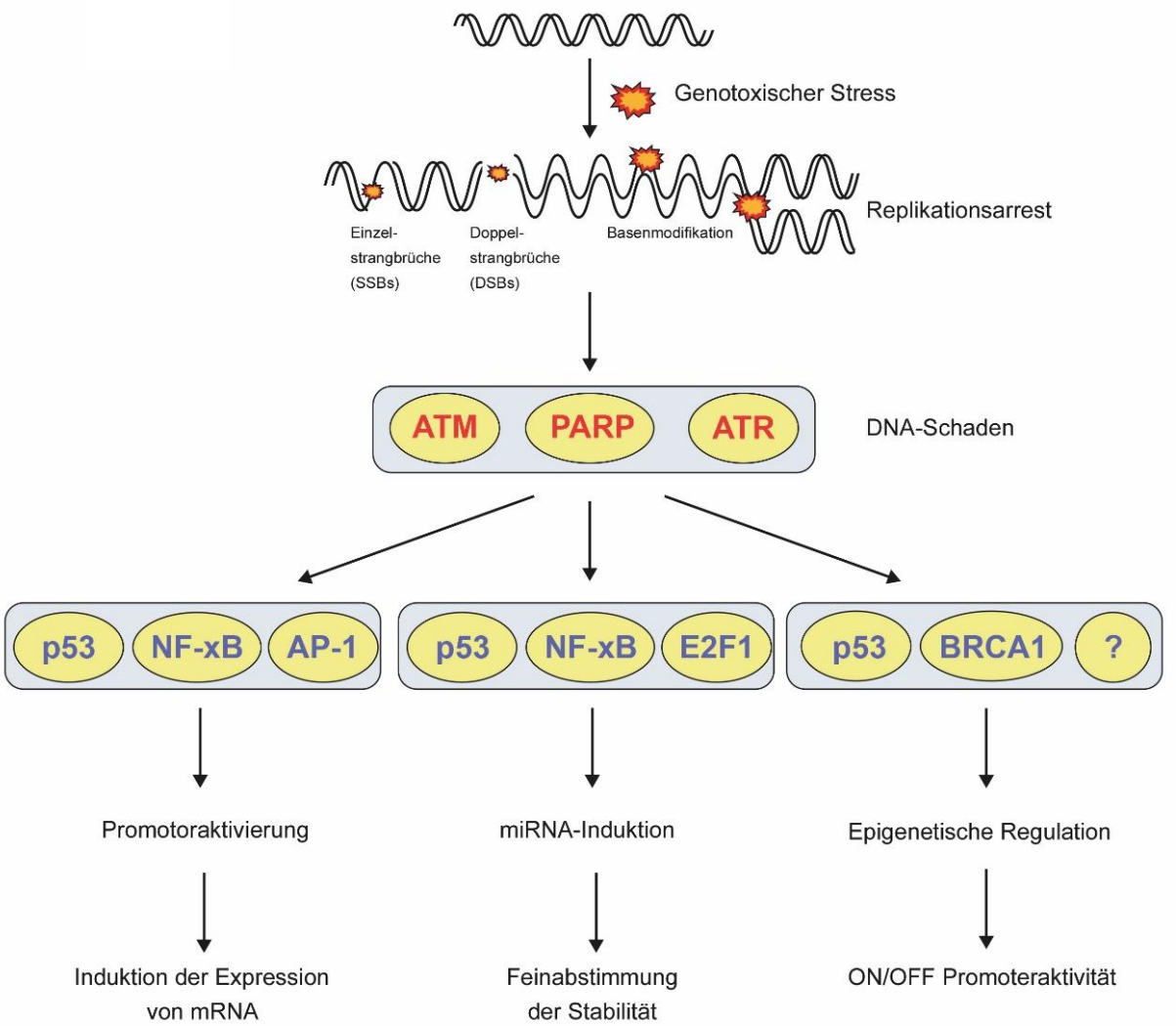


Abbildung 10 **Transkriptionelle Faktoren und dessen Signalgebung in den DNA-Reparaturmechanismen** (nach (Christmann and Kaina, 2013))

1.6.1 Fehlpaarungsreparatur (*Mismatch-Reparatur*, MMR)

Die MMR ist ein Fehlpaarungsreparatursystem der DNA, diese für die Entfernung von Basenfehlpaarungen zuständig ist. Ferner hat die MMR restriktive Datensätze von der Inhibition von mutagenen und kanzerogenen Wirkungen und ihrer Apoptose-Beteiligung (Christmann and Kaina, 2013, Christmann et al., 2002). Die funktionelle MMR fehlt bei 15 % aller sporadischen KRK's und führt zur Mikrosatellitensequenzenveränderung, diese zu einer hohen Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) führt. Gegensätzlich hierzu sind 85 % der KRK's intakt in der MMR. Sie sind mikrosatellitenstabil (MSS) und weisen eine minimale Korrespondenz zu den Mikrosatelliten auf (MSI-L) auf (Tomicic et al., 2019).

Bei der MMR entstehen Fehlpaarungen durch spontane Desaminierung, Oxidation, Methylierung und Replikationsfehler. Es findet eine Korrektur der DNA-Replikationsfehler statt und eine Blockierung bestimmter Rekombinationsereignisse zwischen divergenten DNA-Sequenzen (Modrich and Lahue, 1996).

Der folgende Ablauf der MMR, beginnt mit der Erkennung der DNA-Läsionen und Bindung an den sogenannten MutS α -Komplex. Dieser Komplex besteht aus MutS-homologen Proteinen MSH2 und MSH6 (Christmann et al., 2003, Leach et al., 1993, Fishel et al., 1993). Die differenzierte Unterscheidung zwischen dem Tochter- und elterlichen (parentalen) Strang ist weitgehend nicht geklärt. Eine mögliche Modelldarstellung könnte anhand des komplexen Mechanismus anhand des „Molecular-Switch-Modell“ beschrieben sein (Fishel, 1998, Gradia et al., 1997). Hierbei erfolgt bei der Strangunterscheidung eine exotherme hydrolytische Abspaltung des Adenosintriphosphats (ATP) mit dem Endprodukt des Adenosindiphosphat (ADP). Folglich kann hierbei auch eine umgekehrte Reaktion infolge einer endogenen Reaktion mittels einer Phosphorylierung zwischen ADP und ATP stattfinden (Berardini et al., 2000). Dieser Zyklus führt als energieliefernden und energieverbrauchenden Prozess zur Konformationsveränderung der hydrolyseunabhängigen Gleitklemme, diese wird infolge dessen passiv ab diffundiert und von der Fehlpaarung der DNA dissoziiert (Gradia et al., 1999, Gradia et al., 1997). Weitere Forschungen ergaben, dass eine Identifizierung des Tochterstrang durch nicht-ligierte Einzelstrangbrüche (SSB) stattfinden kann und somit die Identifizierung der Strangunterschiede klar darstellt (Thomas et al., 1991, Christmann et al., 2002).

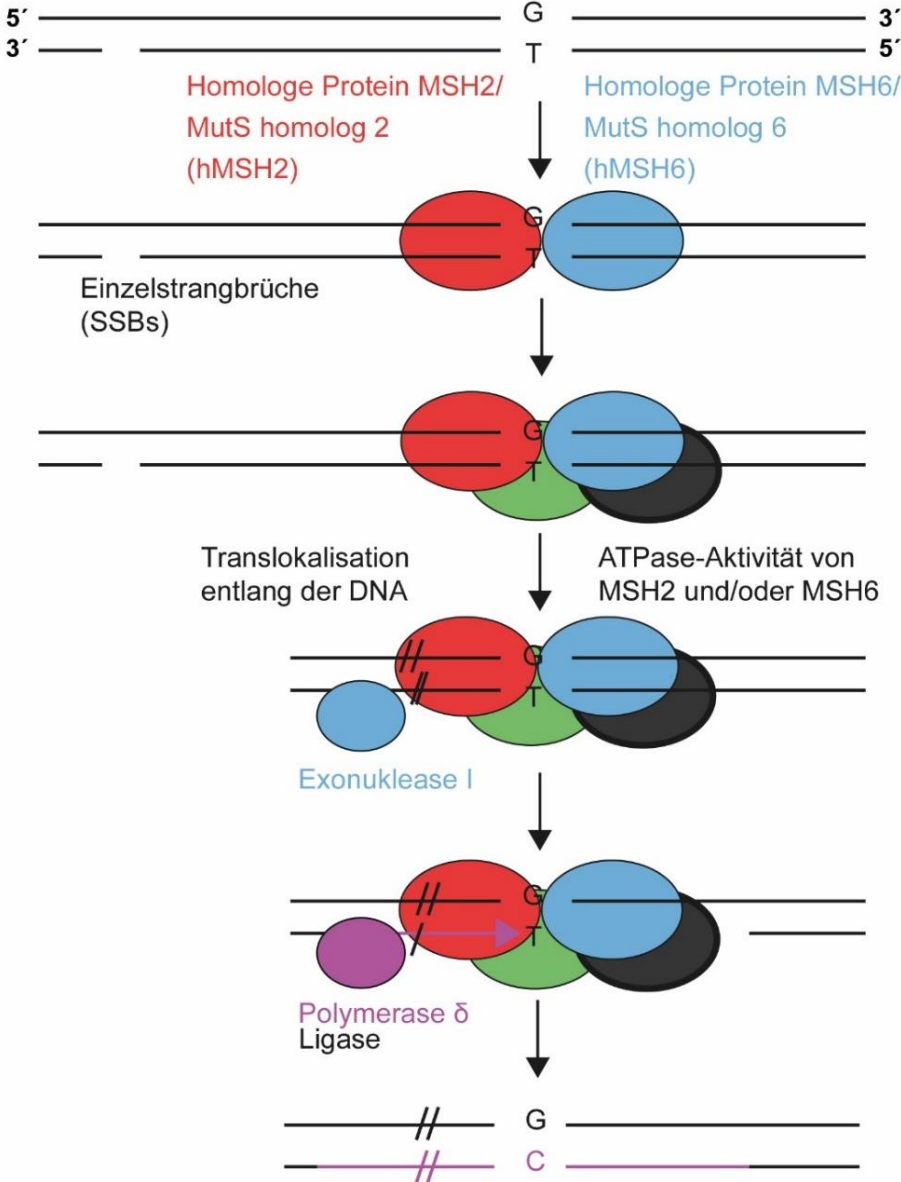


Abbildung 11 **Fehlpaarungsreparatur (MMR)**
(Christmann et al., 2003)

1.6.2 Homologe Rekombination

DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) werden durch hochenergetische ionisierende Strahlung (IR) und durch genotoxische Stoffe induziert. Sie sind somit hochpotente Induktoren von genotoxischen Wirkungen und der Apoptose und gelten als kritische Primärläsionen bei der Entstehung von Chromosomenaberrationen (Lips and Kaina, 2001, Christmann et al., 2003, DIKOMEY J. DAHM-DAPHI I. BRAMMER R. MARTENSEN B. KAINA, 1998, Pfeiffer et al., 2000).

Zur Reparatur von DSBs gibt es zwei unterschiedliche Mechanismen. Die homologe Rekombination findet überwiegend in der S-Phase und der G₂-Phase statt. Hingegen findet die nicht homologe End-zu-End-Verknüpfung (NHER, *non homologous endjoining*, NHEJ) in der G₀/G₁- Phase statt (Christmann and Kaina, 2013, Johnson and Jasin, 2000, Takata et al., 1998).

Die homologe Rekombination (HR) erfordert eine homologe Sequenz zur Reparatur der DNA-Läsion (Takata et al., 1998). Es kommt zu einer nukleolytischen Resektion des DSB in 5'→3'-Richtung durch den MRE11-Rad50-NBS1-Komplex (MRN-Komplex). Infolgedessen wird ein 3'-einzelsträngiges DNA-Fragment gebildet, mittels Rad52 verbunden und in der Interaktion mit RAD51 kommt es zu einem DNA-Strangaustausch (Christmann et al., 2003). RAD51 bindet doppelsträngige DNA (dsDNA) (Zhao et al., 2018). Die Rad51-DNA-Filamente sind an der DNA-Paarung mit der homologen Sequenz und am Strangaustausch beteiligt. RAD51-Paraloge werden von Genen codiert, die durch Duplikationen innerhalb eines einzelnen Genoms verwandt sind (Takata et al., 2000). Diese Rad51-Paraloge werden mithilfe von RAD51B, RAD51C, RAD51D, *X-Ray Repair Cross Complementing 2* (XRCC2) und XRCC3 zu den RAD-Filamenten zusammengesetzt (Christmann et al., 2003, Suwaki et al., 2011). Anschließend erfolgt die Synthese der DNA und deren Ligation. Schlussendlich erfolgt anhand der Zweigmigration eine komplette Auflösung der DNA (Christmann et al., 2003).

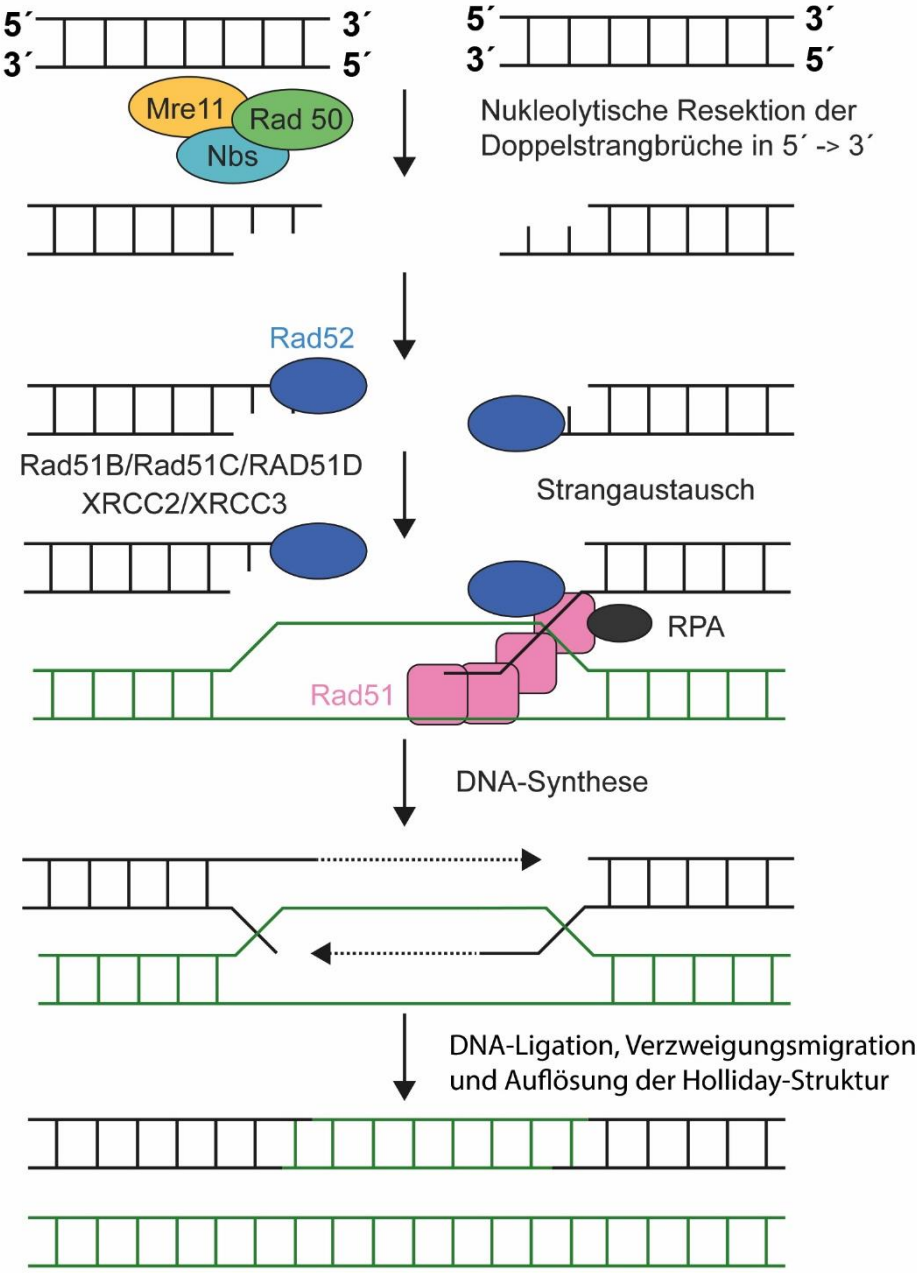


Abbildung 12 **Homologe Rekombination (HR)**
(Christmann et al., 2003)

Bei der Nicht-homologen-Endverknüpfung werden beide Ende eines Doppelstrandbruches (DSBs) unabhängig von der Homologie der terminalen DNA-Sequenzen einfach verknüpft (Takata et al., 1998). Die Prozessierung erfolgt zuerst über die Erkennung von DNA-Schäden anhand des Ku70-Ku80-Komplexes, der von den Genen *XRCC6* und *XRCC5* codiert wird. Dieser Komplex ist einerseits für die DNA-Bindung zuständig und andererseits für die Rekrutierung der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK). Die DNA-abhängige Proteinkinase bildet anschließend ein DNA-PK-Holoenzym. Es erfolgt eine Prozessierung des MRE11–RAD50–NBS1-Komplexes unter Beteiligung von Flap-Endonuklease 1 (FEN1) und *DNA-Cross-Link Repair 1C* (Artemis). Schlussendlich fügt eine terminale Desoxyribonukleotidyltransferase einige Nukleotide zusammen und die DNA-Enden werden durch die Aktivität des XRCC4-Ligase IV-Komplexes ligiert (Christmann et al., 2003).

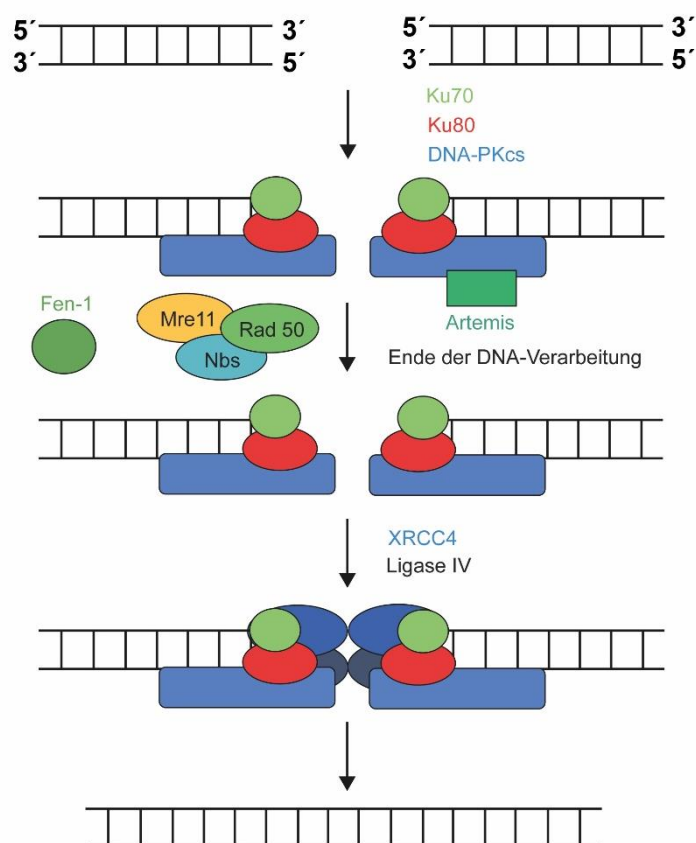


Abbildung 13 **Nicht- Homologe Rekombination (NHER)**
(Christmann et al., 2003)

2 Literaturdiskussion

2.1 Literaturübersicht

Krebs ist weltweit die häufigste Todesursache und das Kolorektale Karzinom (KRK) die dritthäufigste Todesursache im Bereich der Krebserkrankungen (Steigerwald et al., 2018, Kaiser, 2021). Das KRK ist in Europa eine deutliche Ursache für die tumorbedingte Morbidität und Mortalität (Krome, 2022). Um den interdisziplinären Kontext besser weiterzuentwickeln, wurden unter anderem die Darmkrebsfrüherkennung aktualisiert und schafft somit eine fundamentale Auswirkung auf die Inzidenz und Prognose des KRK's (Hofmann-Aßmus, 2022).

In der heutigen Tumorbiologie wird deutlich, dass durch die Entziehung der Apoptose, die malignen Zellen der Selbstelimination entgegenwirken (Kliche et al., 1999, Kerr et al., 1994). Aufgrund dessen ist die Resistenzschwelle für Zytostatika erhöht (Kliche et al., 1999).

Daran anschließend findet bei malignen Tumoren ein intuitives Verhalten der Zellen statt und es kommt zur Apoptose. Folglich findet eine Wachstumsverzögerung des Tumors statt. Therapeutisch wurde dies bei Tumoren nachgewiesen, die auf Radiatio, zytotoxische Chemotherapie, Hormonablation oder auf thermische Therapie ansprechen (Kerr et al., 1994). Durch Überproliferation von Zellen und verminderten Abbau apoptotischer Zellen wird deutlich, dass die Zellzyklusregulation bei Krebserkrankungen dysfunktional ist (King and Cidlowski, 1998). Durch eine Herunterregulierung der pro-apoptotischen Proteine wie Bax oder durch eine Expression von anti-apoptotischen Proteine wie Bcl-2 können Tumorzellen Apoptose-resistent werden (Elmore, 2007). Die Expression dieser Proteine werden über das p53 reguliert (Miyashita et al., 1994). Die Herunterregulierung der pro-apoptotischen Proteine spielt eine wichtige Rolle in der Apoptosehemmung in Bezug auf Survivin (Phuong et al., 2022).

Die große Relevanz von Survivin ist hierbei für die Grundlagen- und Translationsforschung ausschlaggebend. Survivin stagniert mit einer Korrelation der Überlebensrate bei Tumorpatienten über seine Überexpression (Stauber et al., 2007, Altieri, 2006, Lens et al., 2006). Die Hochregulation in den humanen Tumoren nimmt eine schlechte Patientenprognose mit sich. Sowie geht dies mit einer Tumorresistenz

bei einem breiten Spektrum von Chemotherapeutika einher (Adamopoulos et al., 2021). Survivin ist ein Mitglied der Inhibitoren der Apoptose und ist auch als baculoviraler Inhibitor des *Apoptose-Repeat-Containing 5* (BIRC5) bekannt (Wang et al., 2022, Alimujiang et al., 2022). Survivin besitzt keine eigene enzymatische Aktivität und lässt sich wahrscheinlich als Adapterprotein spezifizieren. (Wheatley and Altieri, 2019). Die bifunktionelle Funktion von Survivin wird unterstützt, dass es gehäuft in der Interphase bei Tumorpatienten lokalisiert ist (Engels et al., 2007, Li and Liu, 2001, Li et al., 2005). Survivin hat einen funktionellen Einfluss auf die Zellteilung, die Apoptose, die Migration und die stressinduzierte Signalübertragung (Altieri, 2015). Durch die Bifunktionalität von Survivin und die essentielle Beteiligung in der Mitose, sowie in der Apoptose scheint es ein vielversprechender therapeutischer Ansatz zu sein (Wheatley and Altieri, 2019).

Die prognostische Relevanz der nukleozytoplasmatischen Lokalisation des Survivin besteht darin, dass aktuelle Forschungen ergeben haben, dass präferentielles zytoplasmatisches Survivin einen zytoprotektiven Effekt hat und nukleäres Survivin die Cytokinese kontrolliert. Weitergehend wurde das nukleäre Survivin als günstiger Prädiktor identifiziert, obwohl einige Daten mit einer schlechten Progredienz des Überlebens mit dem nukleären Survivin einhergehen (Li et al., 2005, Engels et al., 2007, Knauer et al., 2007). Dieser Unterschied kann hierbei auf die variablen Kriterien in der Klassifikation eines Tumors als nukleäres Survivin oder zytoplasmatisches Survivin zurückzuführen sein (Stauber et al., 2007). Survivin zeigt bei vielen Tumoren eine Kernakkumulation, dies bei anderen Tumoren im Gegensatz nicht so ausgeprägt ist (Heger et al., 2001, Stauber et al., 2007). Daher ist die Survivin-Zelllokalisierung bzw. deren *Targeting* von entscheidender Bedeutung für das Schicksal von Krebszellen, sowie für die Auswahl der Chemotherapie.

Die Therapieresistenz gegenüber Chemotherapeutika insbesondere der den TOP1-Hemmstoffen wie Irinotecan liegt die Expression der Inhibitoren der Apoptose Proteine (IAPs), wie c-IAP1, c-IAP2, XIAP und Survivin zugrunde (Tomicic and Kaina, 2013).

3 Material

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind im Folgenden aufgeführt.

Tabelle 1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Firma
Ammonium Per Sulfat (APS)	Thermo Scientific, Braunschweig
Aqua dest. (dH ₂ O)	Universitätsmedizin, Mainz
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
CIdU (5-chloro-2-deoxyuridine)	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEN)	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Donkey Serum 10 %	Jackson Immunoresearch, Pennsylvania, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Entwickler	Carestream GBX, Stuttgart
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Fixierer	Carestream GBX, Stuttgart
Genticin (G-418)	Thermo Scientific, Braunschweig
Glycin	Roth, Karlsruhe
IdU (5-iodo-2-deoxyuridine)	TCI, Eschborn
Immersionsöl	Zeiss, Schwerte
Irinotecan Campto [®]	Universitätsmedizin, Mainz
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Nagellack	Essence, Sulzbach
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
NewBlot Nitro Stripping Buffer 5x	LI-COR, Lincoln (USA)
Phosphatpuffer (PBS)	Biochrom, Berlin

Material

Pierce ECI® Wester Blotting Substrate	Thermo Scientific, Braunschweig
Pierce ECI® Plus Wester Blotting Substrate	Thermo Scientific, Braunschweig
Ponceau S 0,1 %	Roth, Karlsruhe
Polyacrylamid	Roth, Karlsruhe
RNase	Sigma Aldrich, München
Roti®-Quant Bradford Reagenz	Roth, Karlsruhe
RPMI Medium 1640 (1X)	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SDS	Roth, Karlsruhe
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific, Braunschweig
Technisches Methanol	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt / Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Trypsin- Ethyldiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich, München
Triton X100	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe

3.2 Puffer und Lösungen

Im Folgenden sind die selbst hergestellten Puffer und Lösungen aufgelistet.

Tabelle 2 Puffer und Lösungen

Puffer	Substratmenge
Blotting Puffer	500 ml Laemmli-stock (5x) 1000 ml MeOH Ad 5 l Aqua bidest.
	100 ml Laemmli-stock (5x) 200 ml MeOH Ad 1 l Aqua bidest.
BSA (5%)	5 g BSA 100 ml Waschpuffer (TBST)
Blockierpuffer	1485 µl 0.1 % Triton X/PBS 165 µl 10 % Donkey Serum
Kolonie-Färbelösung	1000 ml dest. H ₂ O 1.25 g Kristallviolett 12.5 ml Giemsa
Lämmli-Puffer	30 g (0.25M) TRIS 144 g (1.92M) Glycin Ad 1 l Aqua bidest.
Gesamtextraktpuffer	25 µl 1 M Tris HCL (ph=8) 10 µl 500 mM EDTA 10 µl 100 mM PMSF 2 µl 1 M DTT 10 µl 100 mM NABSO ₄ 50 µl 10 % NP40 143 µl 7x Couplete 100 µl 5 M NACL 659 µl H ₂ O 649 µl H ₂ O + 10 µl Phosphatinhibitor

Material

Milch (5%)	5 g Milchpulver 100 ml Waschpuffer (TBST)
Mowiol	5 g Mowiol 6 g Glycerin 6 ml Aqua bidest 12 ml 0.2M TRIS (pH 8.5)
Propidium Jodid (50 µg/ml)	300 µl RNase Stock (10 mg/ml) 30 ml PBS
RNase (0.1 mg/ml)	300 µl RNase Stock (10 mg/ml) 30 ml PBS
SDS (20%)	20 g SDS Ad 100 ml Aqua bidest.
SDS-Electrophorese-Puffer	200 ml Laemmli-stock (5x) 10 ml 10 % SDS Ad 1 l Aqua bidest.
Spreading Puffer	0.1 g auf 20 ml SDS / 0.5 % SDS 2 ml 0.05 M EDTA 4 ml TRIS (1M TRIS) 0.2 M TRIS- HCl (ph=7.4)
TRIS Buffered Saline (TBS)	24.2 g TRIS 80 g NaCl 1000 ml dest.H ₂ O
TRIS Buffered Saline +Tween 20 (TBST)	100 ml TBS (10x) 2 ml Tween 20 900 ml dest.H ₂ O
Zellkulturmedium	500 ml RPMI Medium 50 ml Fötales Kälberserum (10%)

3.2.1 Zelllinien und Zellklone

Die in dieser Arbeit verwendeten eukaryontische Zelllinien sind im Folgenden aufgelistet:

Tabelle 3 Zellstämme und Zellklone

Zelllinie	Beschreibung
SW48	Parentale Zelllinie; Darmkrebs (CRC) - Zelllinie, die vom Patienten mit fortgeschrittenem CRC (Dukes Typ IV), p53-Wildtyp, epigenetisch Ausschaltung für MLH1 (MisMatch Reparatur (MMR) ist defekt -> MSI-H).
SW48 Survivin GFP C3	Der Klon wird durch Transfektion des rekombinanten Plasmids erzeugt, das eine Wildtyp-cDNA-Sequenz von Survivin (BIRC5) enthält, die an grünes Fluoreszenzprotein (pcDNA3-Surv-GFP) fusioniert ist, wodurch Survivin-GFP überwiegend im Zytoplasma exprimiert wird.
SW48 NESmut S6	Der Klon wird durch Transfektion des rekombinanten Plasmids erzeugt, das die cDNA-Sequenz von Survivin (BIRC5) enthält, die zwei Mutationen in der Kernexportsequenz trägt, die ebenfalls an grünes Fluoreszenzprotein (pcDNA3-SurvNESmut-GFP) fusioniert sind, wodurch NES-mutiertes Survivin exprimiert wird -GFP überwiegend im Kern (das Fusionsprotein reichert sich im Kern an).

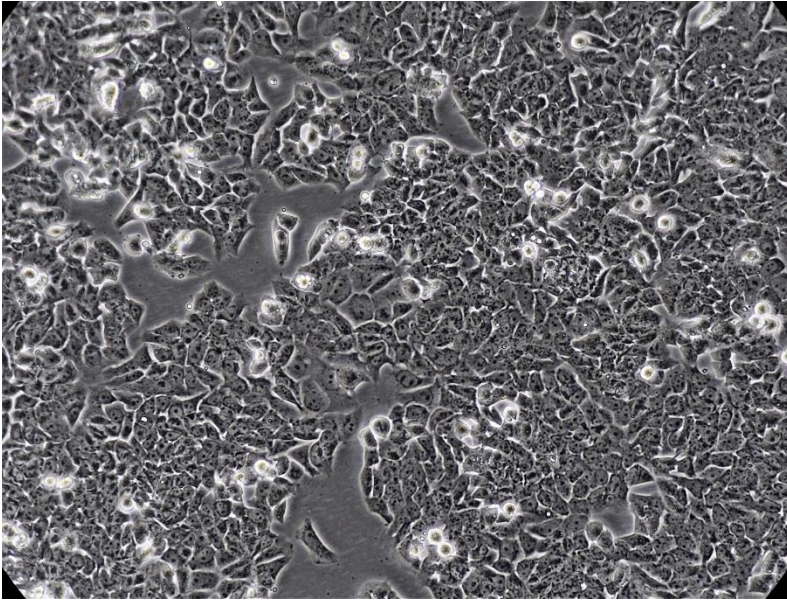


Abbildung 14 **Parentale Zelllinie SW48**
Mikroskopische Aufnahme

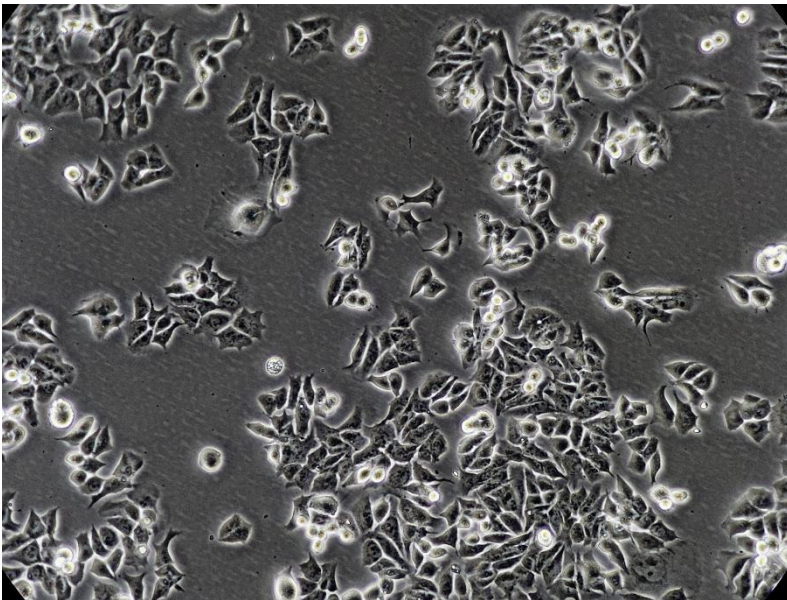


Abbildung 15 **Klonogene Zelllinie SurvGFP C3**
Mikroskopische Aufnahme

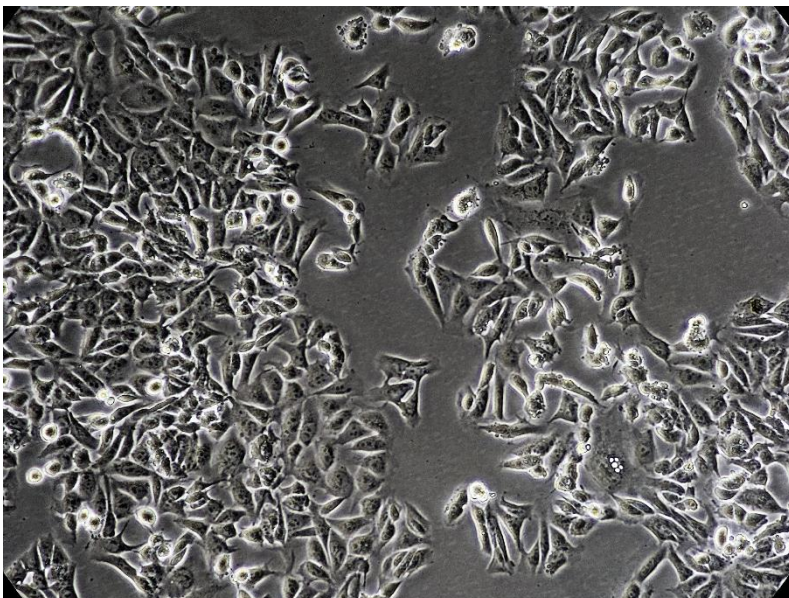


Abbildung 16 **Klonogene Zelllinie SurvNESmut S6**
Mikroskopische Aufnahme

3.3 Antikörper

3.3.1 Primärantikörper

Die Verdünnung wurde wie folgt, in 5 %-iger Milch + 1x TBS 0.2 % Tween oder mittels Bovinen Serumalbumin, gemäß eines 5 ml Standardansatzes für den Western Blot hergestellt.

Tabelle 4 Primärantikörper (Western Blot)

Antigen	Verdünnung	Isotyp	Firma
Akt (pan)	1:1000	Kaninchen m.	Cell Signaling #4691S
Anti-Cleaved PARP 1	1:1000	Kaninchen m.	Abcam (y34) #ab32561
BAX (B-9)	1:1000	Kaninchen m.	Santa Cruz #sc-7480
BAX (N-20)	1:1000	Kaninchen p.	Santa Cruz #sc-493
BCL-X _L	1:1000	Kaninchen p.	Santa Cruz #sc-7195
C-IAP 1 (D569)	1:1000	Kaninchen m.	Cell Signaling #7065S
C-IAP 2 (58C7)	1:1000	Kaninchen m.	Cell Signaling #3130S
CDC25A (F-6)	1:200	Maus m.	Santa Cruz #sc-7389
Cleaved-Caspase 3	1:1000	Kaninchen m.	Cell Signaling #9664S (Asp175)
HSP 90 α/β (F-8)	1:1000	Maus m.	Santa Cruz Biotechnology #C0514 #sc-13119
I κ B-a (C-21) x	1:1000	Kaninchen p.	Santa Cruz #sc-371x

Material

IkB-a (H-4)	1:1000	Maus m.	Santa Cruz #sc-1643
NOXA	1:1000	Kaninchen p.	Abcam #ab13687
p21 (ab109520)	1:2000	Kaninchen m.	Abcam
p-Akt	1:1000	Kaninchen m.	Cell Signaling #4060S
PARP (46D11)	1:1000	Kaninchen m.	Cell Signaling #9532S
P-Histone H2A.X	1:1000	Kaninchen m.	Cell Signaling #9718S
p-p53 (S15)	1:1000	Kaninchen m.	Cell Signaling #92845
p-p53 (Ser46)	1:1000	Kaninchen m.	Santa Cruz Biotechnology #L2911
RAD 51	1:1000	Kaninchen m.	Cell Signaling #8875S
Survivin 71G4B7	1:1000	Maus m.	Cell Signaling #2808
XIAP (D2Z8W)	1:1000	Kaninchen m.	Cell Signaling #14334S
XIAP (phospho S87)	1:1000	Kaninchen p.	Abcam #ab193315

Material

Folgende Primärantikörper wurden für den DNA-Fiber Assay in PBS mit 0.1 % TritonX100 und 2 %-igem Donkey Serum angesetzt:

Tabelle 5 Primärantikörper (DNA-Fiber Assay)

Spezifität	Verdünnung	Isotyp	Firma
Rat- α BrdU	1:100	Ratte IgG	Abcam Klon BU1/75 IRC1
Mouse- α -BrdU	1:100	Maus IgG	BD Biosciences Klon B44

3.3.2 Sekundärantikörper

Die Verdünnung wurde wie folgt, in 5 %-iger Milch + 1x TBS 0.2 % Tween gemäß eines 5 ml Standardansatzes für den Western Blot hergestellt.

Tabelle 6 Sekundärantikörper (Western Blot)

Spezifität	Verdünnung	Isotyp	Firma
Anti-Rabbit	1:2000	Kaninchen IgG	Rockland
Anti- Mouse	1:2000	Maus IgG	Immunochemicals

Folgende Antikörper wurden für den DNA-Fiber Assay in PBS mit 0.1 % Triton X 100 und 2 % Donkey Serum angesetzt.

Tabelle 7 Sekundärantikörper (DNA-Fiber Assay)

Spezifität	Verdünnung	Isotyp	Firma
α Mouse Alexafluor488	1:500	Maus IgG	Invitrogen
Donkey α RatCy3-Fluor	1:250	Ratte IgG	Jackson

3.4 Reaktionskits

Folgende Reaktionskits wurden in dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 8 Reaktionskits

Bezeichnung	Firma/Hersteller
GoTaq® qPCR Master Mix	Promega, Madison (USA)
NucleoSpin® RNA	Macherey-Nagel, Düren
Verso cDNA Synthese Kit	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig

3.5 Primer

Die verwendeten Real-time-Primer und dessen Sequenzanalyse wurden von Sigma, Invitrogen und Eurofins hergestellt. Die Sequenzen wurden nachfolgend angegeben.

Tabelle 9 Sequenzierungsprimer

Primer	Sequenzen (5'→ 3') (F)
	Sequenzen (3'→ 5') (R)
β-Actin	TGGCATCCACGAAACTACC (F) GTGTTGGCGTACAGGTCTT (R)
Bax	ATCAGATGTGGTCTATAATG (F) CAGAAGGCACTAATCAAG (R)
Bcl-2	AGTACCTGAACCGGCACCT (F) TTCAGAGACAGCCAGGAGAAA (R)
Bcl-X _L	TAGGTGGTCATTCAGGTAA (F) AAGCGTAGACAAGGAGAT (R)
BIRC2/ C-IAP1	TTCCCAGGTCCCTCGTATCA (F) CCGGCGGGGAAAGTTGAATA (R)

Material

BIRC3/ C-IAP2	TCACTCCCAGACTCTTTC (F) CCCCGTGTTCTACAAGTGTC (R)
BIRC5/ Survivin	ATGACTTGTGTGTGATGA (F) GTTTGTGCTATTCTGTGAA (R)
BrCA ₁	AAGACTTCTACAGAGTGAA (F) CAGTTCCAAGGTTAGAGA (R)
BrCA ₂	CTACACCACCCACCCTTA (F) CATGACTTGCAGCTTCTC (R)
Exo ₁	ATTGGACATTATCTCAAGATG (F) GCTGATAGAGGAAGGTATT (R)
GAPDH	CATGAGAAGTATGACAACAG (F) ATGAGTCCTTCCACGATA (R)
IL-6	GCTGCAGGACATGACAACCTC (F) AACAACAATCTGAGGTGCCC (R)
IL-8	CCAAACCTTTCCACCCCAA (F) CTCTGCACCCAGTTTTCTT (R)
MGMT	TGAAGGCCACCGGTTGGGGA (F) GACCGCGGGCGTCTGAACTC (R)
MSH ₂	CTTCTTCTGGTTCGTCAGTATAGA (F) ATCATTCTCCTTGGATGCCTTAT (R)
MSH ₆	GAATTTAAGCCAGACACTAA (F) CCTTCACTCTCACTATCC (R)

Material

Noxa	ACACGGTGGACGTCCTGT (F) ACGAAGCACTTGGGGAAGT (R)
p21	ACTCTCAGGGTCGAAAACGG (F) CGGGCTTTGGAGTGGTAGAA (R)
Puma	GACGACCTCAACGCACAGTA (F) CTGGGTAAGGGCAGGAGTC (R)
RAD ₅₁	GGGGTGATCAGTTTCTGTTGC (F) GCACAATCATCTGCAAGTGGG (R)
TP53BP ₁	AAACCCAACCTGTGATGAG (F) AAGAGAAGGAAGAAGATACTT (R)
TP53INP ₁	CCTCCAACCAAGAACCAGAA (F) TTCTTCTGCTGAGAAACCAGTG (R)
XIAP	CTGAGCCAGATCAAAGTATG (F) CCGAAGAGAAACCACATT (R)

3.6 Zytostatikum

Im Folgenden ist das Zytostatikum von der Universitätsmedizin Mainz zur Behandlung der Zelllinien aufgelistet.

Tabelle 10 Zytostatikum

Zytostatikum	Wirkmechanismus
Irinotecan (Campto®)	selektiver Topoisomerase I- Inhibitor DNA-Einzelstrangbrüche (SSBs) Hemmung der Replikation DNA-Doppel-Strangbrüchen (DSBs) Apoptose

3.7 Hilfsmittel

3.7.1 Materialien

Nachfolgend sind die standardgemäß verwendeten Materialien aufgelistet.

Tabelle 11 Materialien

Materialien	Firma
Aluminiumfolie	Roth, Karlsruhe
Barriofilm	FORA, Radolfzell
Cryoröhrchen	Nunc, Schwerte
Deckgläser Hirschmann	Merck, Wertheim
Eppendorf-Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
Film Super RX-N	Fujifilm, Düsseldorf
Flow Cyto/Pk500	Sarstedt, Nümbrecht
Glasflaschen	Schott, Mainz
Glaspipetten	Schott, Mainz
Greiner-Röhrchen	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Austria)
Handschuhe	Sempermed, Wien (Austria) Abena GmbH, Zörbig
Cryo.S Einfrierröhrchen	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Austria)
Kunststoffpipetten	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Austria)
Messzylinder	Universitätsmedizin Mainz
Microseal 'B' PCR Plate Sealing	Bio-Rad, Hercules (CA)
Mikroliter Spritze	Hamilton, Langerwehe
Mini-PROTEAN Comb, 10-well	Bio-Rad, Hercules (CA)
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, Hercules (CA)
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda- Königshofen
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare, Little Chalfont (UK)
Objektträger Superfrost	Thermo Scientific GmbH, Braunschweig
Parafilm	Bemis, Neenah (WI)
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
Petrischalen	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Austria)
Pinzette	HU Friedy, Frankfurt am Main

	Ustomed, Tuttlingen
Pipetten	Abimed, Langenfeld Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Austria) Biozym, Hessisch Oldendorf
Skalpell	Aesculap AG, Tuttlingen
96-Well Mikrotiterplatte	Sarstedt, Nümbrecht
384er-Well PCR Platte	Bio-Rad, Hercules (CA)
Whatman Blotpapier	GE-Healthcare, Little Chalfont (UK)
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Austria)
Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Austria)

3.8 Geräte

Im Nachfolgenden sind die standartgemäß verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 12 Geräte

Geräte	Firma
Analyse- und Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen
BD FACSCanto™	BD Biosciences, Heidelberg
BIO-RAD Mini Protean Tetra System	Bio-Rad, Hercules (CA)
Bunsenbrenner	IBS Integra Biosciences, Biebertal
Detektionsgerät iBright CL1000	Thermo Scientific, Braunschweig
Eismaschine CoolNat	Ziegra, Iserhagen
Gefrierschränke (- 20°C)	Liebherr, Bulle FR, Schweiz
Gefrierschränke (- 4°C)	Liebherr, Bulle FR, Schweiz
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Inkubatoren	Thermo Scientific, Braunschweig Heracell™ 150 Heraeus, Hanau
Kühlschrank	Liebherr, Bulle FR, Schweiz VWR International, Darmstadt

Material

Laser Scan Mikroskop 710	Zeiss, Jena
Mikroskop	Zeiss, Jena
Mikroskop Bildschirm	Apple, Kalifornien (USA)
Mikroskop Kamera	Discover Echo, San Diego (USA)
Mikrovolumen-Spektralphotometer	Thermo Scientific, Braunschweig
Mikropipette	Brans, Wertheim
NanoDrop™ 2000	Thermo Scientific, Braunschweig
Mini Protean II SDS-PAGE Apparatur	Bio-Rad, Hercules (CA)
Photometer	Tecan, Männedorf Schweiz
Pipetboy	Berthold Technologies, Bad Wildbad
	Integra Biosciences, Biebertal
qRT-PCR-System	Bio-Rad, Hercules (USA)
Rotatoren	Sunlab®, Heidelberg
Schüttler	Heidolph, Schwalbach
	Labnet International, Edison (USA)
	Stuart, Stone (USA)
Sonifizierer	Branson, Dietzenbach
Sterilisierbank	Thermo Scientific, Braunschweig
Thermocycler T100™	Bio-Rad, Hercules (CA)
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	Merck, KGaA, Darmstadt
Ultraschallbad	Bandelin, Berlin
Vakuumpumpe	Neuberger, Freiburg
Vortex Mixer	Bender & Hobein, Zürich
	Janke & Kunkel, Staufen
Wasserbad	Grant instruments, UK
Zentrifugen	Biozym, Hessisch Oldendorf
	Eppendorf, Hamburg
	Hereaus, Hanau
	Thermofisher Scientific, Braunschweig

3.9 Software

Im Folgenden sind die für diese Arbeit verwendete Software aufgelistet.

Tabelle 13 Software

Software	Firma
BD FACSDiva™	Biosciences, San Jose (USA)
CFX Manager™	Bio-Rad, Hercules (USA)
ChemDraw	Perkin Elmer, Waltham (USA)
Corel Draw	Corel Corporation, Ottawa (Kanada)
EndNoteX9	Clarivate Analytics
Excel	Microsoft, Redmond (USA)
Google Scholar	Google, Kalifornien (USA)
GraphPad Prism 9	Graphpad Software, La Jolla (CA)
ImageJ	Wayne Rasband NIH (USA)
NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Braunschweig
Power Point	Microsoft, Redmond (USA)
PubMed	Nationalbibliothek für Medizin, Maryland (USA)
Word	Microsoft, Redmond (USA)
ZEN2009	Zeiss, Jena

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Kultivierung, Expansion und Lagerung

Die humane Kolorektalkarzinom - Zelllinie SW48 wurde von ATCC (American Type Culture Collection) bezogen und stammt von einem Patienten mit fortgeschrittenem KRK (Dukes Typ IV). Die parentale Zelllinie SW48 ist mit einem p-53 Wildtyp aligniert und wurde epigenetisch für MLH-1 ausgeschaltet.

Die Survivin-exprimierenden Klone SW48 Survivin GFP C3 und SW48 NESmut S6 wurden ebenfalls von ATCC erworben. Diese Klone wurden mittels basierter Transfektion von pcDNA3-Surv-GFP oder pcDNA3-SurvNESmut-GFP von Survivin (BIRC5) fusioniert. Beide Survivin-exprimierenden Klone sind mit eGFP markiert. SW48 Survivin GFP C3 wird überwiegend im Zytoplasma exprimiert, wohingegen SW48 NESmut S6 zwei Mutationen in der Kernexportsequenz trägt und somit das Fusionsprotein-GFP im Zellkern anreichert.

Die Zellen wurden in Gibco Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS) bei 37 °C und 5 % CO₂ Zufuhr kultiviert und inkubiert.

Tabelle 14 Medium und Komponenten für die Zellkultur

Medium	Firma
Phosphatpuffer (PBS)	Biochrom, Berlin
Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Darmstadt
RPMI Medium 1640 (1X)	Thermo Fisher Scientific,
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Braunschweig
Trypsin/ EDTA	Sigma-Aldrich, München

Das Antibiotikum von Thermo Fisher Scientific, wurde mit einer Menge von 75 µl den Kultivierungsmedien der klonogen Zelllinien SW48 Surv. GFP C3 und SW48 NESmut S6 hinzugegeben. Die Zelllinien wurden mit keinem Pen-Strep behandelt.

Tabelle 15 Antibiotikum

Bezeichnung	Wirkmechanismus
Geneticin (G-418)	Anwendung an bestimmter Selektion transformierter und transfizierter Zellen Vernetzung komplementärer DNA-Stränge Strangbrüche

4.1.2 Kultivierung und Aussaat der Zellen

Die Zellen wurden auf 10 cm Platten und in 25 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂-Zufuhr kultiviert. Für Versuche wurden die Zellen in 6 cm Schalen ausgesät und bei denselben Bedingungen inkubiert. Bevor die Zellen auf der Platte konfluent wurden, wurde die kontinuierliche Zellkultur gesplittet. Zu diesem Zweck wurde das alte Medium entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, durch Trypsin/EDTA und Inkubation bei 37 °C im Inkubator von der Platte gelöst. Sobald die adhärennten Zellen sich gelöst hatten, wurde die Reaktion durch Zugabe von 4.5 ml frischem Kulturmedium beendet und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren separiert. Ein Teil der Zellsuspension wurde entfernt bzw. verworfen. Schließlich wurde mit frischem Medium auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt und die Zellen konnten entweder in einem gewünschten Verhältnis zum Erhalten der kontinuierlichen Zellen oder für Versuche ausgesät werden. Zusätzlich wurden beim Splitten der Zellen 75 µl des Antibiotikum Geneticin 418 (G-418) pro klonogene Kulturflasche zugesetzt.

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Hierzu wurden 13 µl der Zellsuspension auf die Kammer pipettiert. Die Zählung der Zellen fand am Lichtmikroskop statt und die Zellzahl wurde mithilfe von Formel 1 berechnet.

Formel 1 Zellzahlbestimmung

$$\text{Volumen einzusetzende Zellsuspension} = \frac{10.000 \left(\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}\right) \times \text{Endvolumen (10.000-Verdünnung) [ml]}}{\text{Gemessene Zellzahl} \left(\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}\right)}$$

$$\text{Endvolumen 10.000-Verdünnung} = \text{Volumen einzusetzende Zellsuspension} + \text{Medium}$$

4.1.3 Irinotecan-Behandlung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellen mit Irinotecan (Stock: 1.6 mM, 1mg/ml) behandelt. Die für die jeweiligen Endkonzentrationen einzusetzenden Volumina der Stocklösung wurden mithilfe von Formel 2 berechnet.

Formel 2 Irinotecan-Behandlung

$$\frac{\text{Behandlung } [\mu\text{M}] \times \text{Medium } [\mu\text{l}]}{\text{Stock } [\mu\text{M}]} = \text{Behandlungsmenge } [\mu\text{l}]$$

Anhand von Tabelle 16 können die verwendeten Irinotecan-Volumina entnommen werden.

Tabelle 16 Irinotecan-Behandlungsmenge.

Irinotecankonzentration [μM]	Volumen Irinotecan pro 5 ml Kulturmedium [μl]
0.5	1.56
1.0	3.13
2.0	6.25
2.5	7.81
3.0	9.38
4.0	12.5
5.0	15.63

4.2 Durchflusszytometrie

Fluorescence activated cell sorting (FACS) ist eine spezielle Form der Durchflusszytometrie. Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Quantifizierung und Sortierung sowie die gleichzeitige Messung von Größe und Granularität der Zellen.

Die Zellen wurden 48 h nach Aussaat mit Irinotecan behandelt und 24, 48, 72, 96, 120 h nach der Behandlung geerntet. Da für die SubG1-Analyse auch die toten Zellen wichtig sind, wurde das alte Medium nicht verworfen und in einen 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurde mit 5 ml PBS gewaschen und dieses mit dem Medium vereint. Trypsin/EDTA wurde zum Ablösen der adhären Zellen von der Platte verwendet und diese inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Sobald die Zellen gelöst waren, wurde Medium hinzugefügt, die Zellen vereinzelt und ebenfalls in die 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden für 5 Min bei 1500 upm zentrifugiert, der Überstand entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend erneut entfernt und das Zellpellet in 200 ml PBS resuspendiert. Zur Fixierung der Zellen wurden 3 ml 70% -iger Ethanol tropfenweise beim Vortexen zu den Zellen gegeben, diese bei - 20 °C aufbewahrt wurden. Zur Vorbereitung der Zellen für die Analyse am Durchflusszytometer wurden diese für 5 min bei 1500 upm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde für 30 min an der Luft getrocknet und danach in 330 µl RNase resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 170 µl Propidiumiodid (PI), welches zur Färbung der DNA verwendet wird, zu den Proben gegeben. Die Auswertung der Messung am Durchflusszytometer wurde mit *BD FACSDiva*TM durchgeführt.

4.3 Koloniebildungsassay

Der Koloniebildungsassay ist ein *in vitro* Assay zur Untersuchung der Überlebens- und Teilungsfähigkeit einzelner Zellen (Brasemann et al., 2015).

In dieser Arbeit wurden Zellen der Zelllinien SW48, SW48 Surv. GFP C3 und SW48 NESmut S6 zu je 1000 Zellen pro 6 cm Platte ausgesät und 48 h später mit Irinotecan behandelt (0.5 µM, 1.0 µM, 2.0 µM, 3.0 µM, 4.0 µM und 5.0 µM). Die Zellen wurden für 14 Tage inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Anschließend wurde das Medium entfernt, zweimal mit 2 ml PBS gewaschen und die Zellen fixiert. Hierfür wurden diese

für 5 min mit 2 ml Methanol überschichtet. Die fixierten Zellen wurden mit 2 ml Kristallviolett gefärbt. Die Färbelösung wurde nach 20 min abgeschüttet, Überreste wurden mit Wasser abgewaschen und die Platten an der Luft getrocknet. Die Kolonien (mindestens 40 Zellen) wurden schließlich ausgezählt.

4.4 Proteinanalyse

4.4.1 Blaue Extrakte – Zellyse

Die Aussaat der Zellen für die blauen Extrakte für den Western Blot erfolgte in Abhängigkeit der Zeitwerte und Behandlungen. Nur die lebenden Zellen wurden 24, 48, 72, 96 oder 120 h nach der Behandlung geerntet.

Zur Lyse wurde der ROTI®Load Puffer (1:4/ ROTI®Load:H₂O) verwendet und die Zellen wurden anschließend sonifiziert.

Tabelle 17 Aussaat Blaue Extrakte SW48

	Zelllinie SW48	Medium [μ l]	Zellsuspension [μ l]
24/48h	Kontrolle	4.7 ml	250 μ l/5ml
	Behandlung	4.5 ml	500 μ l/5ml
72/96/ 120h	Kontrolle	4.87 ml	125 μ l/5ml
	Behandlung	4.750 ml	250 μ l/5ml

Tabelle 18 Aussaat Blaue Extrakte SW48 Surv.GFP C3

	Zelllinie SW48 Surv.GFP C3	Medium [μ l]	Zellsuspension [μ l]
24/48h	Kontrolle	4.65 ml	350 μ l/5ml
	Behandlung	4.3 ml	700 μ l/5ml
72/96/ 120h	Kontrolle	4.825 ml	175 μ l/5ml
	Behandlung	4.65 ml	350 μ l/5ml

Tabelle 19 Aussaat Blaue Extrakte SW48 Surv.NESmut S6

	Zelllinie SW48 Surv. NESmut S6	Medium [μ l]	Zellsuspension [μ l]
24/48h	Kontrolle	4.65 ml	350 μ l/5ml
	Behandlung	4.3 ml	700 μ l/5ml
72/96/ 120h	Kontrolle	4.825 ml	175 μ l/5ml
	Behandlung	4.65 ml	350 μ l/5ml

4.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay

Zur Quantifizierung des Gesamtproteins wurde der Bradford Assay angewendet (Bradford, 1985). Hierbei wurde die Proteinkonzentration der Lysate photometrisch bestimmt.

Die Proteinbestimmung nach Bradford wurde in einer 96 Mikrotitrierplatte durchgeführt. Als Standardprotein für die Erstellung der Eichgerade wurden verschiedene Konzentrationen von bovinem Serumalbumin (BSA) verwendet (0, 1, 2, 3, 4 and 5 μ g/ml). Von den Zelllysaten wurden 1.5 μ l in Duplikaten pipettiert. Bei zu hoher Proteinkonzentration wurden diese zuvor mit destilliertem Wasser vorverdünnt. Anschließend wurden 200 μ l Bradford-Reagenz sowohl zu den Wells mit BSA als auch mit den Proteinlysaten hinzu pipettiert und die Platte für 10 min bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurde die UV-Absorption am Photometer bei 620 nm und die Proteinkonzentrationen der Lysate wurden mithilfe linearer Regression in Excel bestimmt.

4.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Page findet eine Separation geladener Probenmoleküle in einer Gelmatrix innerhalb eines elektrischen Feldes statt (Wien, Oktober 2006).

Zur Auftrennung der Proteinlysate wurden in dieser Arbeit 12 % -ige Polyacrylamid Gele verwendet. Zuerst wurde das Trenngel gegossen und danach das Sammelgel, sobald das Trenngel polymerisiert war (Tabelle 20).

Tabelle 20 SDS-Page Trenngel und Sammelgel

Komponenten	Volumina Trenngel	Volumina Sammelgel
H ₂ O	10.2 ml	8.8 ml
0.5M TRIS (ph=6.8)	6 ml	1.5 ml
Acrylamid 37:1	7.2 ml	1.5 ml
20% SDS	120 µl	120 µl
APS	120 µl	120 µl
TEMED	12 µl	12 µl

Für den folgenden Gesamtextraktpuffer wurden wie folgt unter Tabelle 2, die zu verwendeten Flüssigkeiten angesetzt. Des Weiteren wurden vorab die Zellproben aufgetaut und auf Eis gestellt. Die Proben wurden nacheinander mit einer Menge von 250 µl in einzelne Greiner-Röhrchen überführt und resuspendiert. Nachdem wurden sie in Eppendorf Tubes aliquotiert und bei - 4°C, 15 min auf einen Überkopfschüttler gestellt.

Nach Ablauf der Zeit wurden die Aliquots für 15 - 20 min bei 10.000 upm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellpellets mittels einer Pipette trockengelegt, um das Zelllysat bei - 20°Grad einzufrieren. Das Zelllyssat wurde vor der SDS-Page vorbereitet und anschließend für die SDS-Page verwendet.

4.4.3.1 SDS-Gelelektrophorese

Die Proben wurden hierfür aufgetaut und anhand der Auswertung des Bradford Testes 30 µg Protein pro Probe in jeweils ein Eppendorf Tube pipettiert. Diese wurden mit Wasser und dem ROTI®Load -Puffer auf ein Volumen von 40 µl auf pipettiert. Die Proben wurden anschließend gevortext und zentrifugiert. Alle Protein-Proben wurden mittels Heizblock auf 95 Grad für 5 Minuten erhitzt. Währenddessen wurde das SDS-Gel für das Beladen der Proteine vorbereitet. Das SDS- Gel wurde hierfür in die dafür vorgesehene Mini Protean II SDS-PAGE Apparatur fixiert. Folgend wurde der Laufpuffer hineingegeben.

Anschließend wurde mittels einer Pipette oder mittels der Hamilton Mikroliter Spritze die Probenaschen durchgespült. Das Probenvolumen sollte weniger Volumen als Taschenvolumen betragen (Luttmann et al., 2014).

Die Positionierung des Proteinstandards Thermo Scientific™ Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder erfolgte anhand eines Volumens von 5 µl in die erste Probenasche.

Folglich wurde die Elektrophorese auf 30 mA für 10-15 Minuten eingestellt. Ergab sich daraus eine Bande wurde das Gerät auf 50 mA erhöht und für weitere 30 - 40 Minuten eingestellt. Wenn die Lauffront das Ende der Glasplatte erreichte, wurde die Elektrophorese beendet und für den Western Blot vorbereitet.

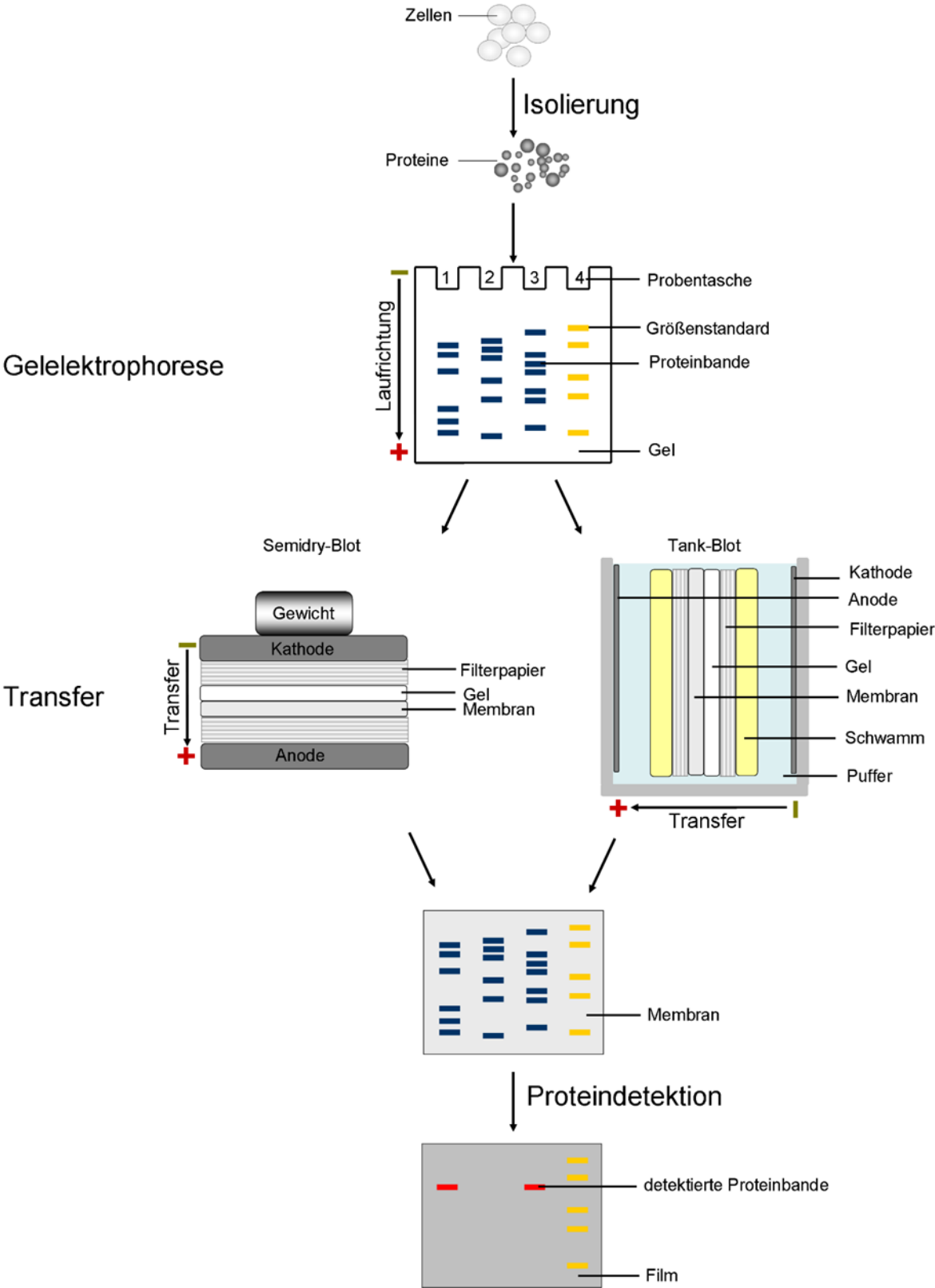


Abbildung 17 **Western Blot**
(Mit freundlicher Genehmigung von © Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag)
(Joppien, 1. Auflage 2010)

4.4.4 Immunblotting

Die Proteine der SDS-Page werden auf eine Membran übertragen, bei dem jedes Protein eine eigene Bande darstellt (Mahmood and Yang, 2012). Diese Übertragung von Proteinen auf eine Membran nennt man Western Blot.

Für den Transfer der Proteine wurde zuerst der Blotting Puffer nach Tabelle 2 hergestellt. Anschließend wurde das Gel von den Glasplatten der SDS-Page im Blotting Puffer gelöst und das Sammelgel wurde abgetrennt. Für den Transfer der Proteine wurde das Gel auf die Nitrocellulosemembran fixiert. Im Blotting Puffer wurden die Whartmann Filterpapiere und die Schwämme getränkt. Anschließend erfolgte der Aufbau des sogenannten Wet-Blot. Dieser Aufbau erfolgte nach einem bestimmten Sandwichverfahren. Auf das Kunststoffgitter wurde zuerst ein Schwamm und folgend zwei Whartmann Filterpapiere gelegt. Nun wurde das Gel mit der zuständigen angefeuchteten Membran auf das Filterpapier blasenfrei gelegt. Ein erneutes Filterpapier, sowie ein Schwamm wurden auf die Membran gelegt und somit das Kunststoffgitter verschlossen. Der Wet-Blot wurde in die dafür vorgesehene BIO-RAD Mini Protean Tetra System befestigt. Anschließend wurde ein Kühlakku hinzugefügt oder der Western Blot fand in einem Kühlraum statt. Der Blotting Puffer wurde in die Blotting Box aufgefüllt und der Vorgang der Proteintransfer gestartet. Hierbei wurde die Spannung angelegt und der Strom auf 200 mA für eine Stunde eingestellt.

Nach dem Blotten wurde die Membran aus dem Kunststoffgitter gelöst und mittels Ponceau S 0.1% in einer Schale angefärbt. Erfolgte ein vollständiger Proteintransfer, sind hierbei Proteinbanden ersichtlich. Diese Färbung wurde anschließend mittels dem Waschpuffers entfernt.

Das unspezifische Binden des Antikörpers an die Membran, wird durch das sogenannte Blocken verhindert (Mahmood and Yang, 2012). Das Blocken erfolgte mittels einer 5% -iger Milchlösung für mindestens eine Stunde. Das vorliegende Casein in der Milchlösung kann die Ergebnisse beeinflussen (Mahmood and Yang, 2012). Bei phosphorylierten Proteinen wurde hierfür eine 5 % -ige BSA-Lösung verwendet.

Die Herstellung des Primärantikörpers erfolgte mittels eines 5 ml Ansatzes in einem Greiner-Röhrchen. Hierfür wurden je nach Herstellerangaben ein Volumen von 5 ml der 5 % -igen Milchlösung oder des 5 % -iges Rinderserumalbumin (BSA) anhand Tabelle 4 verwendet. Die Inkubation mittels Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4° Grad im Kälteraum im Greiner-Röhrchen. Dieser Primärantikörper ist für ein bestimmtes Protein generiert und zeigt eine antigenspezifische, unmarkierte Bindung auf. Im Anschluss dessen wurde die Membran mit dem Waschpuffer dreimal für 10 Minuten gewaschen. Folgend wurde der Sekundärantikörper, anhand Tabelle 6 hergestellt. Die Membran inkubierte im Antikörper bei Raumtemperatur für 90 Minuten auf einem Rollschüttler. Je nach Spezifität des Primärantikörpers wurde für den Sekundärantikörper ein Anti-Mouse oder Anti-Rabbit hergestellt. Nach der Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte ein erneutes Waschen für dreimal je 10 Minuten.

4.4.5 Proteindetektion

Die Proteindetektion erfolgte in dieser Arbeit mit dem iBright CL1000 von Thermo Fisher und überwiegend analog via Filmentwicklung. Hierbei wurden die zu benötigten Reagenzien in der Dunkelkammer für die Filmentwicklung vorbereitet. Die Membran wurde anschließend mit dem Pierce ECL Western Blotting Substrate für zwei Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran in die dafür vorgesehene Filmkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurden die entsprechenden Film Super RX-N von Fuji vorbereitet. Folgend wurden diese in die Kassette eingelegt und für eine bestimmte Zeit exponiert. Bei dem Nachweis von dem Protein Survivin sind hierbei 2-3 Minuten Expositionszeit notwendig, hingegen zur Ladekontrolle mit dem Hitzeschockprotein 90 (HSP 90), welches bei einer Expositionszeit von 2-3 Sekunden lag. Das Stärkesignal ist hierbei abhängig von der Expositionszeit oder der Dauer in der Entwicklungsflüssigkeit. Aufgrund dessen waren verschiedene Expositionszeiten für die unterschiedlichen Proteinnachweise nötig. Der Film wurde folgend aus der Kassette entfernt und in den Entwickler gelegt, folgend in Wasser gewaschen und letztendlich im Fixierer fixiert. Anschließend wurde der Film getrocknet, die Proteinbanden des Markers eingezeichnet und ausgewertet. Die Membran wurde bei - 20° Grad eingefroren oder für weitere Nachweise mit einem weiteren Antikörper markiert und das jeweilige Protein detektiert.

4.4.6 Stripping

Das Stripping der Membran erfolgte mittels NewBlot Nitro Stripping Buffer 5x. Hierbei wurde die Membran für 10 Minuten in destilliertes Aqua gewaschen. Anschließend inkubierte die Membran für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rollschüttler. Nun wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mittels Waschpuffer gewaschen. Daraufhin konnte eine erneute Markierung mittels einem Antikörper stattfinden, wenn dieser zuvor die bereits detektierte Membran bei einer Proteinbande überlagert hätte.

4.5 DNA

4.5.1 DNA - Fiber Spreading Assay

Der DNA - Fiber Spreading Assay, gibt Aufschluss über die Veränderung in der Replikation und dessen Dynamik genomweit wieder (Quinet et al., 2017). Hierbei werden Thymidin-Analoga in die DNA integriert und während der DNA-Synthese in der S-Phase des Zellzyklus durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen.

In diesem Zusammenhang werden Informationen über den Fortschritt der DNA-Replikation unter normalen Bedingungen sowie über den Replikationsstress, dieser durch Umweltgenotoxikationen oder Krebsmedikamente induziert wird und ermittelt. Das Verfahren basiert auf der Immundetektion von 5-Iodo-2-Deoxyuridin (IdU) und 5-Chlor-2-Deoxyuridin (CldU) und dessen Bindung an die Antikörper Rat- α BrdU (Klon BU1/75 (IRC1) von Abcam, Donkey α RatCy3-Fluor, Mouse- α -BrdU-Antikörper (Klon B44, BD Biosciences) und α Mouse Alexafluor488. Dies ermöglicht die Analyse der Replikationsdynamik, einschließlich sofortiger und langfristiger Effekte nach einer DNA-schädigenden Behandlung wieder (Nikolova et al., 2017).

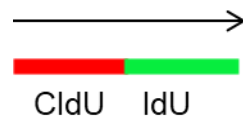


Abbildung 18 **DNA-Labeling**
Die zu synthetisierende DNA wurde als erstes mit CldU (rot) und anschließend mit IdU (grün) gelabelt.

4.5.1.1 Vorbereitung

Zur Vorbereitung des DNA-Fiber Assay, wurden 150.000 - 200.000 Zellen in 5 ml Vollmedium (RPMI) ausgesät. Des Weiteren wurde 2.5 mM Iod-Desoxyuridin (IdU) aus 40 mg IdU Pulver in 45 ml vorgewärmtes Medium ohne Serum hergestellt und anschließend in 2 ml Eppendorf Tubes aliquotiert. Der Thymidinanaloga 5-Chlordesoxyuridin (CldU) wurde mit einer Gesamtkonzentration von 2.5 mM mittels 3.3 mg CldU Pulver in 5 ml vorgewärmtes Medium ohne Serum unter der Sterilbank hergestellt und 20 Minuten bei 37° Grad im Wasserbad erwärmt. Anschließend wurde der CldU- Analoga in 1.5 ml Eppendorf Tubes aliquotiert und bei - 20° Grad eingefroren.

Vor Beginn des Versuches wurde die IdU-Stock Lösung in einem 37° Grad warmen Wasserbad aufgetaut, sowie bei 70° Grad für 30 Minuten im Heizblock aufgelöst. Danach erfolgte die Zugabe von 18 ml vorgewärmten Medium (1:10) in einer Kulturflasche. Die Endkonzentration lag hierbei bei 250 µM, das IdU wurde im Brutschrank für 60 Minuten zum Equilibrieren aufbewahrt. Das CIdU wurde ebenfalls im Wasserbad bei 37° Grad aufgetaut, gevortext und in den Brutschrank für 60 Minuten equilibriert. Des Weiteren wurden entsprechende Eppendorf Tubes beschriftet und auf Eis zusammen mit 25 ml PBS gelegt. Das Aliquot des Spreading buffer wurde bei Raumtemperatur für mindestens eine Stunde aufgetaut und gevortext. Anschließend wurden die Superfrost Objektträger mit der Zelllinie, mit der Behandlungsdauer oder als Kontrolle beschriftet. Der Spreading Puffer wurde für die Denaturierung der DNA mittels einem 20 ml Ansatz anhand Tabelle 2 angesetzt. Des Weiteren wurden 20 ml von einer 37 % -igen Säure mit gekühlten 80 ml Wasser hinzugegeben, das eine 2.5 M Lösung HCl entstand (1:4). Das Eindeckelmedium Mowiol wurde anhand von Tabelle 2 in einem 50 ml Greiner-Röhrchen hergestellt. Hierbei wurde bei Raumtemperatur das Mowiol, Glycerin und Aqua für 1 Stunde quellen gelassen. Anschließend wurden 12 ml 0.2 M TRIS hinzugegeben und für 15 min gekocht, nachfolgend wurde es für 15 min bei 3000 upm zentrifugiert.

4.5.1.2 Markierung und DNA-Spreading

Alle folgenden Schritte bis zur Fertigstellung der Slides fand unter Gelblicht statt und unter der Sterilbank statt, da die DNA mit den eingebauten Desoxyuridinen lichtempfindlich ist und es zur Photolyse kommen kann. Für die Markierung der Zellen wurden zuerst 50 µl (1:100 bei 5 ml Vollmedium) von dem CIdU Stock in die Zellkulturflasche im Liegen hinzugegeben, das eine Endkonzentration von 25 µM erreicht wurde. Die Flasche wurde infolgedessen aufgerichtet, leicht geschwenkt, wieder hingelegt und für 20 Minuten im Inkubator inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das Medium abgesaugt, mittels PBS gewaschen und 5 ml IdU in die aufgerichtete Flasche gegeben, diese wurde hingelegt und für weitere 25 Minuten im Inkubator inkubiert wird.

Nach der Inkubation wurde das Medium vollständig abgesaugt und mittels 5 ml PBS gewaschen. Die Menge des PBS-Volumen war nun abhängig von der Zellzahl, angestrebt wurden hierbei eine 40 - 50 % -ige bzw. eine 60 - 70 % -ige Konfluenz. Es wurden je nach Konfluentität zwischen 700 µl und 1500 µl PBS hinzugegeben. Unter Verwendung einzelner Zellschaber wurden die Zellen von der Zellkulturflasche abgekratzt, in ein 1.5 ml Eppendorf-Röhrchen pipettiert und auf Eis gestellt. Die Zellsuspension wurde gevortext und es wurden 2 µl der Probe mittels Pipette auf den oberen mittleren Teil des Objektträgers gegeben. Diese wurden 3 Minuten getrocknet und folgend mit 10 µl Spreading buffer durch einmaliges auf- und abpipettiert und für 7 Minuten inkubiert.

Folgend wurden die Objektträger in einem Winkel von 15° Grad auf eine Glaspipette gelegt. Der Tropfen sollte bei dieser Neigung langsam, aber gleichmäßig den Objektträger entlang nach unten laufen. Wenn der Tropfen entlang des Objektträgers gelaufen ist, wurden die Objektträger für 40 Minuten luftgetrocknet und anschließend mit dem Methanol/Essigsäure (1:4) Fixiermittel für 2 Minuten in einer Färbeküvette fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Objektträger für 20 Minuten luftgetrocknet und über Nacht in einem Stain Tray bei 4° Grad im Kühlschrank aufbewahrt. Für den nächsten Tag wurden 500 ml PBS und 100 ml autoklaviertes Wasser bei 4° Grad aufbewahrt.

4.5.1.3 DNA-Denaturierung

Am zweiten Versuchsmorgen wurde das Donkey Serum und das PBS bei Raumtemperatur aufgetaut und equilibriert. Die Proben wurden auf den Objektträgern zweimal mittels H₂O für 5 min gewaschen und anschließend einmal mit 2.5 M HCl für weitere 5 Minuten gewaschen. Die Denaturierung erfolgte 75 Minuten lang mit 2.5 M HCl im geschlossenen Stain Tray, bei Raumtemperatur. Im Anschluss der Denaturierung wurden die Objektträger erneut dreimal 5 min mit PBS gewaschen.

4.5.1.4 Blocken

Der Blocking Puffer bestand aus 0.1 % -igen Triton X100/PBS, und es wurden 150 µl auf jeden Objektträger pipettiert, mit Parafilm bedeckt und für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Blocking-Lösung entfernt.

4.5.1.5 Immundetektion

Der primäre Antikörper wurden in 1265 µL in PBS mit 0.1 % TX und 2 % Donkey Serum gegeben, mit 12.65 µl RataBRDU (1:100) und mit 12.65 µl MouseαBRDU (1:100) in einem Eppendorf Tube anhand von Tabelle 5.angesetzt. Für die 2 % -ige Donkey Serum Lösung wurden 2940 µl 0.1 % Triton/PBS und 50 µl des 10 % -igem Donkey Serum anhand der Tabelle 2 pipettiert.

Insgesamt wurden pro Objektträger 115 µl des primären Antikörpers verwendet, mit Parafilm bedeckt und für 90 Minuten im Stain Tray inkubiert. Anschließend wurden die OT, dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen und kurz getrocknet, indem man die OT schräg auf das Papier hält.

In der Zwischenzeit wurde der sekundäre mit 5.06 µl Cy3-gekoppelter Anti-Ratten-Antikörper (1:250), αMouse Alexafluor488 (1:500) mit 2.53 µl und 1265 µl 2 % -iger Donkey Serum - Lösung anhand Tabelle 7 angesetzt. Nun wurde der Antikörper auf die Objektträger wie vorab im ersten Schritt beschrieben mit Parafilm bedeckt. Die Inkubationszeit war hierbei 90 Minuten.

Nach der Immundetektion wurden die Proben im Stain Tray erneut dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen und für 2 Minuten auf Papier getrocknet.

Der abschließende Vorgang war das Eindecken des Objektträgers, hier wurden die Objektdeckel 30 µl mit einem 37° C konstant erhitztem Mowiol pipettiert und anschließend wurde der Objektträger umgedreht und auf das Deckglas gelegt. Der OT mit dem Deckglas wurde unter Verschluss von Papier komprimiert, sodass das überschüssige Eindeckelmedium entweichen konnte. Abschließend erfolgte das Versiegeln mittels eines klaren Nagellackes. Zum Schluss wurden die Proben im Stain Tray über Nacht bei - 4° Grad im Kühlschrank aufbewahrt.

Der in dieser Arbeit durchgeführte DNA-Fiber Assay wurde im Laufe der Zeit optimiert und die Inkubationszeit der jeweiligen Vorgänge verlängert bzw. verkürzt. Weitere detaillierte Beschreibungen siehe unter 5.1.6.

4.5.1.6 Laser-Scanning-Mikroskopie und DNA-Faseranalyse

Die Aufnahmen der Proben wurden mit dem Laser-Scan-Mikroskop 710 (LSM) von Zeiss mit der Software ZEN2009 aufgenommen. Hierbei wurden verschiedene Pulsmarkierungen in einem Roten oder Grünen Farbstoff aufgenommen (Nikolova et al., 2017).

Die DNA-Faseranalyse wird in fünf verschiedene Arten der DNA-Spuren unterschieden:



Abbildung 19 **DNA-Faseranalyse** ((Nikolova et al., 2017))

Typ 1	Beidseitig laufende Replikationsgabeln mit einem bestimmten Ursprung
Typ 2	Einseitig laufende Replikationsgabeln
Typ 3	Blockierte Replikationsgabeln, Nachweis von CIdU
Typ 4	Replikationsgabel beginnend an benachbarte Replikationsursprünge, DNA-Synthese in diesem Genom ist abgeschlossen
Typ 5	Neue Ursprünge sichtbar, Nachweis von IdU, kein Nachweis von CIdU

Tabelle 21 **DNA-Faserspurtypen** (modifiziert nach (Nikolova et al., 2017))

Die roten Spuren zeigen die entsprechende CIdU-Markierung des Primärantikörpers, sowie dessen Nachweis mittels dem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper. Die grünen Spuren weisen die zweite Markierung des Primärantikörpers IdU und des Alexa488-Sekundärantikörper wieder (Nikolova et al., 2017).

4.6 Transkriptomanalyse

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine fundamentale Methode zur Vervielfältigung von DNA *in vitro*. In der quantitativen Real-Time PCR wird anhand von Fluoreszenz-Messungen die DNA direkt während der PCR quantifiziert.

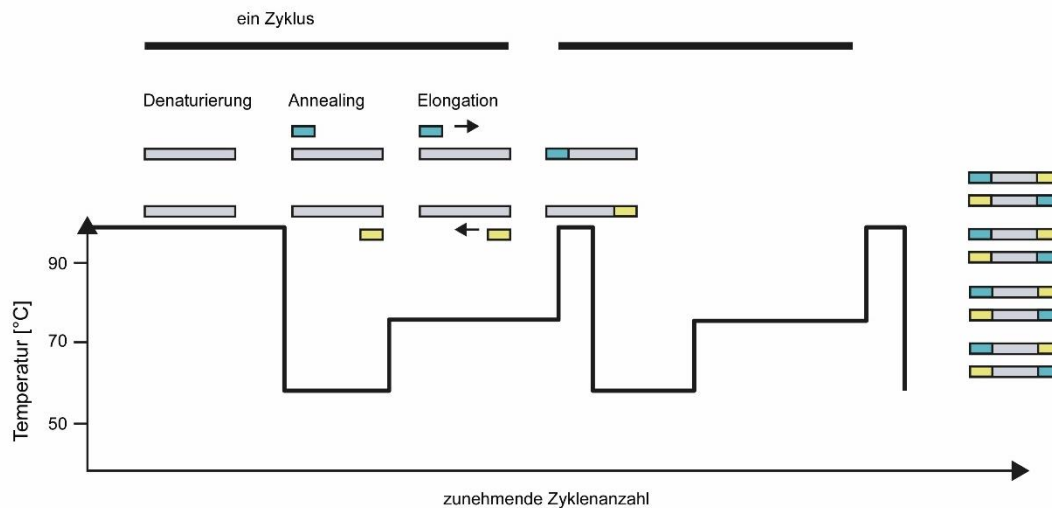


Abbildung 20 **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**
(Holzapfel and Wickert, 2007)

Die PCR obliegt dem Mechanismus der DNA-Replikation, hierbei erfolgt ein wiederholter Prozess von Denaturierung, Primeranlagerung (Annealing) und Verlängerung (Elongation) der DNA. Anhand des Temperaturprofils und des Mechanismus werden hierbei in kürzester Zeit exponentielle Amplifikationen der DNA hergestellt.

Die Zellen der Zelllinien SW 48, Surv. GFP C3 und Surv. NESmut S6 wurden auf 10 cm Platten ausgesät und nach 48 h mit 2.5 μ M Irinotecan behandelt. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 24, 48, 72, 96 und 120 h wie in 4.1 beschrieben.

4.6.1.1 RNA-Isolation

Zur Isolation von mRNA wurde das *NucleoSpin® RNA Protokoll* (Machery-Nagel GmbH & Co. KG) verwendet. Zuerst wurden die Zellen in 350 µl Buffer RA1 und 3.5 µl β-Mercaptoethanol resuspendiert und gevortext (Lyseschritt). Danach wurde das Zelllysate in das lila farbende NucleoSpin® Filter-Tube System überführt und für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der erste NucleoSpin® Filter verwendet und 350 µl des 70 % -igen Ethanol in die jeweiligen Tubes gegeben und 5-mal auf- und abpipettiert. Nun erfolgte die RNA-Bindung an das blaue NucleoSpin® Filter-Tube System. Hierfür wurde das Lysat in den Filter überführt und für 30 sec bei 11.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde ein neues Tube verwendet um die Membran mit 350 µl Desalting Buffer (MDB) zu entsalzen. Die Tubes wurden für 1 min zentrifugiert. Zur Verdauung der DNA wurde ein Mastermix aus 10 µl Rekombinante DNase (rDNase) und 90 µl Reaktions Puffer pro Probe vorbereitet und jeweils 95 µl von diesem zu den Lysaten gegeben. Die Membran wurde für 15 min bei RT inkubiert und anschließend einmal mit 200 µl Puffer RAW2 gewaschen und für 30 sec bei 11000 x g zentrifugiert. Dies wurde mit 600 µl und 250 µl Puffer RAW3 wiederholt. Im letzten Waschschrift wurde für 2 min zentrifugiert. Die Eluierung der RNA erfolgte in ein frisches 1.5 ml Reaktionsgefäß nach Zugabe von 60 µl RNase-freiem Wasser. Nach 1 min Zentrifugation lag das fertige Lysat vor. Die RNA wurde bei - 80° Grad aufbewahrt.

4.6.1.2 cDNA-Synthese

Mithilfe des Mikrovolumen-Spektralphotometers *NanoDrop™ 2000* wurde die Konzentration der mRNA ermittelt. Es wurde eine Doppelmessung durchgeführt. Ausgehend von den ermittelten Konzentrationen konnte die einzusetzende Menge für die cDNA-Synthese berechnet werden. Die cDNA-Synthese erfolgte mithilfe des *Verso cDNA Synthese Kit* von Thermo Fisher. Das Pipettierschema ist in Tabelle 22 angegeben. Zuerst wurde die RNA zu dem RNase freien Wasser gegeben und für 5 min bei 70 °C erhitzt. Danach wurde der Mastermix bestehend aus den übrigen Komponenten hinzugegeben. Schließlich wurden die Proben im Cycler für 1 h bei 42 °C und nachfolgend für 2 min bei 95 °C erhitzt. Nach der Synthese wurden alle Tubes mit 30 µl H₂O auf insgesamt 50 µl aufgefüllt und bei - 20° eingefroren.

Tabelle 22 *cDNA-Synthese*

Komponenten	Substratmenge
RNA und RNase freies H ₂ O	1 µg + 10 µl
5x Puffer	4 µl
dNTP's	2 µl
RNA Primer (random Hexamer)	1 µl
RT Enhancer	1 µl
Verso Enzym	1 µl

4.6.1.3 qPCR

Die qPCR wurde in Triplikaten und anhand des GoTaq® qPCR Master Mix Protokolls am CFX384™ Real-Time PCR Detektionssystem durchgeführt.

Zuerst wurde die cDNA mit RNase freiem Wasser im Verhältnis von 1:10 verdünnt. Auch die Primer (Tabelle 9) wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt. Es wurde ein Mastermix aus SYBR Green, Primer, RNase freiem Wasser wie in Tabelle 23 angegeben hergestellt. Für die qPCR wurde eine 384-er Wellplatte verwendet, in welche 2 µl der cDNA pro Well pipettiert wurden. Anschließend wurden 8 µl des Primer-Master Mix hinzugegeben. Zur Kontrolle wurden β-Actin und Gapdh analysiert. Schließlich wurde die Platte mit Microseal 'B' PCR-Platten-Verschlussfolie versiegelt und für 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Die qPCR wurde mithilfe des *CFX384™ Real-Time System Programms* durchgeführt und mit der CFX Manager™ Software ausgewertet.

Tabelle 23 *Real-Time qPCR mit dem GoTaq® qPCR Master Mix Kit*

Komponenten	Substratmenge
SYBR Green	5 µl
Primer	1 µl
RNase - free H ₂ O	2 µl
cDNA	2 µl

5 Ergebnisse

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Dissertation wurde der Einfluss der intrazellulären Lokalisation von Survivin (zytoplasmatisch versus nuklear) auf die Antwort von kolorektalen Krebszellen gegenüber Irinotecan (CPT-11) untersucht.

Die Fähigkeit zur Koloniebildung nach Behandlung mit den steigenden Konzentrationen von Irinotecan, als Zeichen des reproduktiven Überlebens, und dementsprechend der Zytotoxizität, wurde mittels des Koloniebildungstest (Colony-forming Assay=CFA) untersucht. Der Nachweis des Survivin-GFP Fusionsproteins in kolorektalen Karzinomzellen SW48 und dessen Klone SW48 Surv. GFP C3 und SW48 Surv.NESmut S6 wurde mittels der Western-Blot-Analyse untersucht. Der Zelltod bzw. die Apoptosefrequenz samt Zellzyklusverteilung wurde mittels der Durchflusszytometrie (FACSCanto II, DIVA Software, BD Biosciences) durchgeführt. Des Weiteren wurden die Ereignisse in der S-Phase des Zellzyklus, in dieser die Replikation stattfindet, in den parentalen Zellen und den rekombinanten Zellklonen mittels des DNA-Fiber Assays untersucht. Die transkriptionelle Aktivität nach Behandlung mit unterschiedlichen Irinotecan-Konzentrationen wurde zeitabhängig mittels quantitativer PCR (qPCR) durchgeführt und entsprechend ausgewertet.

5.1.1 Koloniebildung

Zuerst wurden die mutmaßlichen Unterschiede in der Proliferationskapazität bzw. im reproduktiven Überleben der in der niedrigen Anzahl ausgesäten Zellen anhand der Koloniebildung unter Irinotecan-Exposition der parentalen und den Survivin-exprimierenden Zellklonen untersucht.

Die SW48 Zellen und die SW48-Survivin-exprimierenden Zellklone wurden mit den steigenden Irinotecan-Konzentrationen (0.5 - 5.0 μM) behandelt. Die sichtbaren Kolonien wurden nach 14 Tagen mit Methanol fixiert, angefärbt und ausgezählt. Die unter der Irinotecan-Behandlung beobachtete Abnahme der Koloniebildungsfrequenz wurde im Verhältnis zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle (gesetzt auf 100%) berechnet. Die Daten wurden hierbei in technischen Triplikaten erstellt.

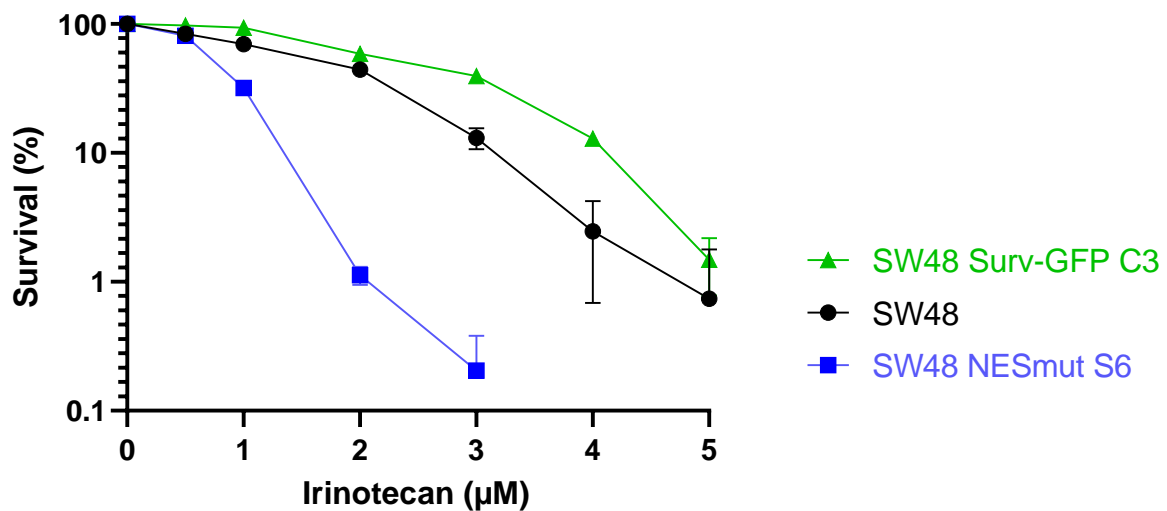


Abbildung 21 **Colony forming assay (CFA)**

Die Zelllinien SW48, SurvGFP C3 und NESmut S6 wurden Die Zellen wurden ausgesät, nach 2 Tage mit den steigenden Konzentrationen von IT behandelt. 14 Tage später wurden die Kolonien im Methanol fixiert, in Kristall-Violett angefärbt und ausgezählt.

Im vorliegenden Versuch ist ersichtlich, dass die SurvNESmut S6 Zellen (Survivin-Expression prädominant im Kern) bei der in den Massenaussaat-Versuchen (Massenzellkultur, z.B. für die durchflusszytometrische Untersuchungen) ermittelten moderat toxischen Konzentration (2.5 μM Irinotecan) kaum noch Kolonien bilden können. Im Gegensatz hierzu überleben die parentalen Zellen SW48 und die Zellen mit einer überwiegenden Expression von Survivin im Zytoplasma (SW48 Surv-GFP C3) zu 70 - 80%. Die toxische Dosis liegt bei 5.0 μM Irinotecan. Bei einer auch im Massenaussaat klaren toxischen Konzentration von 5 μM Irinotecan bilden noch immer ca. 1% der SW48 und SW48 Surv-GFP C3 Zellen Kolonien (Anhang 3).

5.1.2 Induktion des Zelltodes und der Zellzyklus - Verteilung nach Exposition mit Irinotecan

Bei malignen Tumoren kommt es zu Alterationen in Bezug auf die Regulation des Zellzyklus. Öfters treten Defekte an den Kontrollpunkten im Zellzyklus auf.

In der G1-Phase des Zellzyklus hat eine Zelle einen DNA-Gehalt von 2C. In der S-Phase wird die DNA verdoppelt (Replikation), hierbei liegen die Zellen zwischen 2C und 4C vor. Folglich ist in der G2-Phase und M-Phase mit einem diploiden DNA-Gehalt von 4C zu rechnen.

Die Auswertung des Zellzyklus bzw. des Zelltodes erfolgte in den bereits beschriebenen Zelllinien. Die Zelllinien SW48, SW48 Surv. GFP C3 und SW48 Surv. NESmut S6 wurden nach einer Behandlungszeit von 48 Stunden mit Irinotecan (2.5 μ M und 5.0 μ M) behandelt.

Nach 48 h lag der Anteil der SW48 in der SUB-G1 bei 10 % bzw. 15-20 % nach einer Behandlung mit 2.5 bzw. 5.0 μM IT. Nach 72 h lag SUB-G1 bei 10 % bzw. 12 %. Hierbei ist kein signifikanter Unterschied in der Toxizität ersichtlich.

Weitergehend lag der SUB-G1 Anteil bei 96 h bei 20 % bzw. 30 %, sowie nach 120 h bei 35 % bzw. 50 %, dies weist auf eine wesentlich höhere Toxizität hin.

In der Zellzyklusverteilung wurden die Zellen je nach ihren Eigenschaften in vier Kategorien Sub-G1, G1, S, G2 und >2n eingeteilt. In der Zellzyklusverteilung ist ersichtlich, dass die Zellen unter einem G2-Arrest bei 72 Stunden unterliegen.

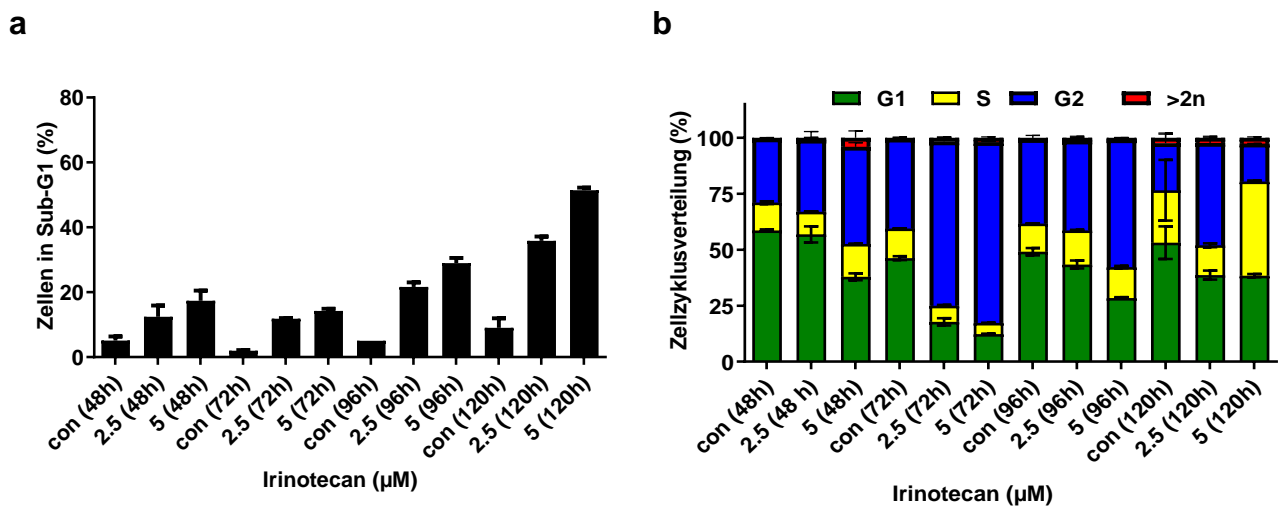


Abbildung 22 **Durchflusszytometrische Analyse SW48 I/III**
 mit der Quantifizierung des Zelltods / SubG1 (a) und dessen entsprechenden Histogramme (siehe Anhang),
 sowie die Zellzyklusverteilung nach der Exposition von SW48 mittels 2.5 bzw. 5.0 μM IT (b).
 Die Zellen wurden hierbei in die dazugehörigen Zellzyklus-Phasen Sub-G1, G1, S, G2 und >2n eingeteilt.

Ergebnisse

Nach 48 h lag der Anteil der Surv-GFP C3 in der SUB-G1 bei 15 % bzw. 10 % nach einer Behandlung mit 2.5 bzw. 5.0 μM IT. Nach 72 h lag SUB-G1 bei 15 % bzw. 20 %. Weitergehend lag der SUB-G1 Anteil bei 96 h bei 20 % bzw. 25 % und bei 15 % bzw. 20 % innerhalb der 120 h. Hierbei ist kein signifikanter Unterschied in der Toxizität ersichtlich, es zeigt den protektiven Schutz der Surv-GFP C3 Zellen.

In der Zellzyklusverteilung ist ersichtlich das die klonalen Zellen Surv-GFP C3 erst ab 120 h einen G2-Arrest zufolge haben und somit einer höheren Toxizität im Gegensatz zu den parentalen Zellen standhalten.

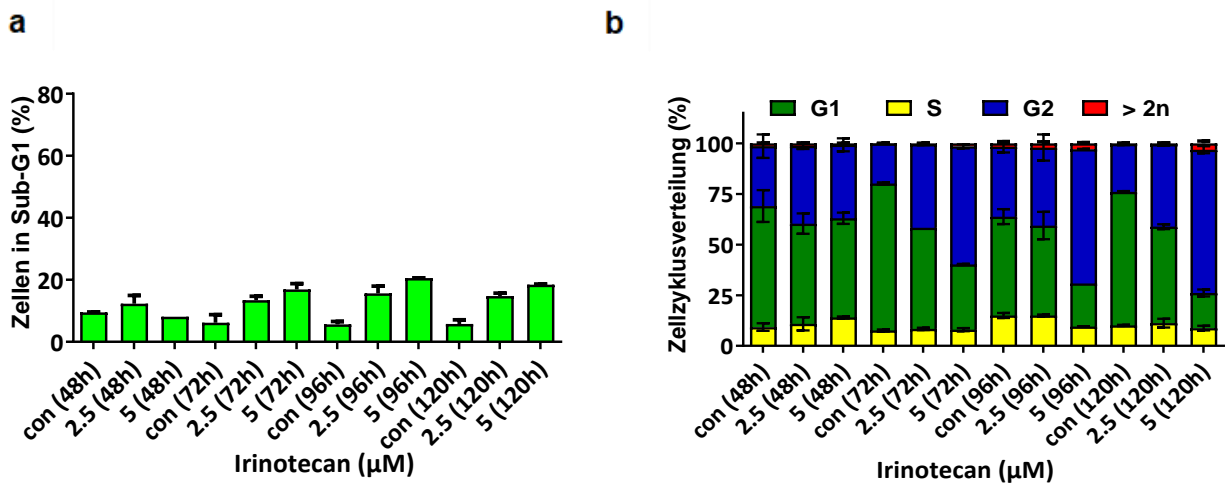


Abbildung 23 **Durchflusszytometrische Analyse Surv.GFP C3 II/III**
mit der Quantifizierung des Zelltods / SubG1 (a) und dessen entsprechenden Histogramme (siehe Anhang),
sowie die Zellzyklusverteilung nach Exposition von Surv.GFP C3 mittels 2.5 bzw. 5.0 μM IT (b).
Die Zellen wurden hierbei in die dazugehörigen Zellzyklus-Phasen Sub-G1, G1, S, G2 und >2n eingeteilt

Ergebnisse

Nach einer Behandlung mit 2.5 μM bzw. 5.0 μM IT lag der Anteil der NESmut S6 in der SUB-G1 nach 48 h bei 8 % bzw. 10 %. Nach 72 h bei 35 % bzw. 43 %. Nach 96 h bei 45 % bzw. 60 % Sowie nach 120 h lag der SUB-G1-Anteil bei 50 % bzw. 55. Dies weist auf eine wesentlich höhere Toxizität von IT auf die Zellen hin.

In der Zellzyklusverteilung ist ersichtlich das die klonale Zelllinie NESmut S6 viel früher in den G2-Arrest als die parentalen und SurvGFP C3 Zellen übergeht. Hierbei ist bereits der 48 Zeitwert entscheidend.

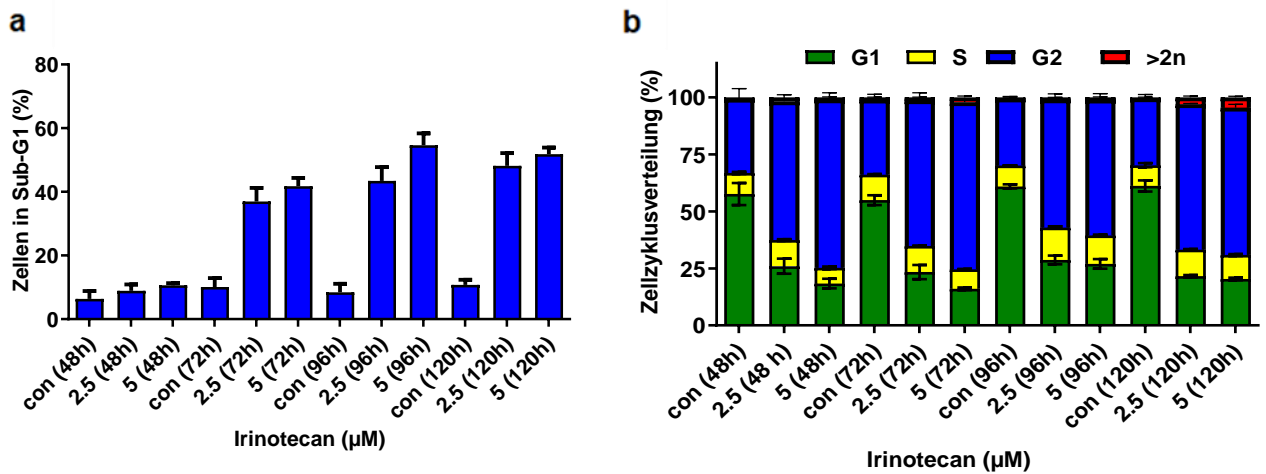


Abbildung 24 **Durchflusszytometrische Analyse Surv.NESmut S6 III/III** mit der Quantifizierung des Zelltods / SubG1 (a) und dessen entsprechenden Histogramme (b), sowie die Zellzyklusverteilung nach Exposition von Surv.NESmut S6 mittels 2.5 bzw. 5.0 μM IT (c). Die Zellen wurden hierbei in die dazugehörigen Zellzyklus-Phasen Sub-G1, G1, S, G2 und >2n eingeteilt.

5.1.3 Ermittlung der transkriptionellen Aktivität rekombinanter Klone nach Exposition mit 2.5 µM IT

Die parentalen Zellen SW48 und die Klone Surv.GFP C3 und Surv.NESmut S6 wurden für 48 h und 96 h mit 2.5 µM Irinotecan behandelt und anschließend wurde die RNA isoliert. Mittels qPCR wurde die transkriptionelle Aktivität entscheidender pro- und anti-apoptotischen Gene, der Zellzyklus-, und der DNA-Reparatur-Gene-wie auch einiger Zytokin-Marker überprüft. Hierbei sind folgende Genmarker berücksichtigt worden: *c-IAP1*, *c-IAP2*, *Survivin (BIRC5)*, *XIAP*, *MGMT*, *MSH2*, *MSH6*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BAX*, *IL-6*, *IL-8*, *TP53BP1*, *TP53INP1*, *BCL-2*, *BCL-XL*, *PUMA*, *NOXA*, *EXO1*, *RAD51* und *p21*

In der qPCR-Analyse innerhalb der parentalen Zelllinie SW48 ist eine starke Expression von *PUMA* und *NOXA* nach einer 48-stündigen Behandlung ersichtlich. Des Weiteren zeigt *p21* eine Überexpression in den behandelten Zellen auf, was auf einen p53-positiven Status dieser Zellen hinweist. Weiterführend ist nach der 96 h-Irinotecan-Behandlung eine minimal erhöhte Expression von *Survivin*, *BAX*, *BCL-XL* und *IL-6* ersichtlich. Keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression sind in den anderen Markern deutlich.

Um zu analysieren, ob in den kolorektalen Krebszellen mit einer prädominanten zytoplasmatischen Expression von *Survivin*, welche resistenter gegenüber Irinotecan sind, die wichtigen Faktoren transkriptionell verändert sind, wurde die transkriptionelle Aktivität (mRNA Hoch- oder Unterregulation) im *Survivin*-GFP C3 Klon mittels qPCR durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Induktion von *c-IAP2* stattfindet, dies auf eine Resistenz hindeuten würde. Spezifisch, nach Behandlung für 48 h konnte gezeigt werden, dass *PUMA* und *NOXA* signifikant exprimiert sind, was ebenfalls für eine Resistenz gegenüber Irinotecan sprechen würde. Es konnte eine signifikante Induktion von *p21* und eine starke Repression von *IL-6* und *IL-8* nach Behandlung für 96 h nachgewiesen werden, was auch für eine erhöhte Überlebenskapazität bzw. gegen ein Auftreten von Seneszenz in diesen Zellen spricht.

Weitere Analysen zur transkriptionellen Aktivität des SurvNESmut S6 Zellklons zeigten eine geringe Repression von *Survivin*, *c-IAP2*, *PUMA* und *NOXA* und eine deutlich erhöhte Expression von *IL-8* und *p21*.

Ergebnisse

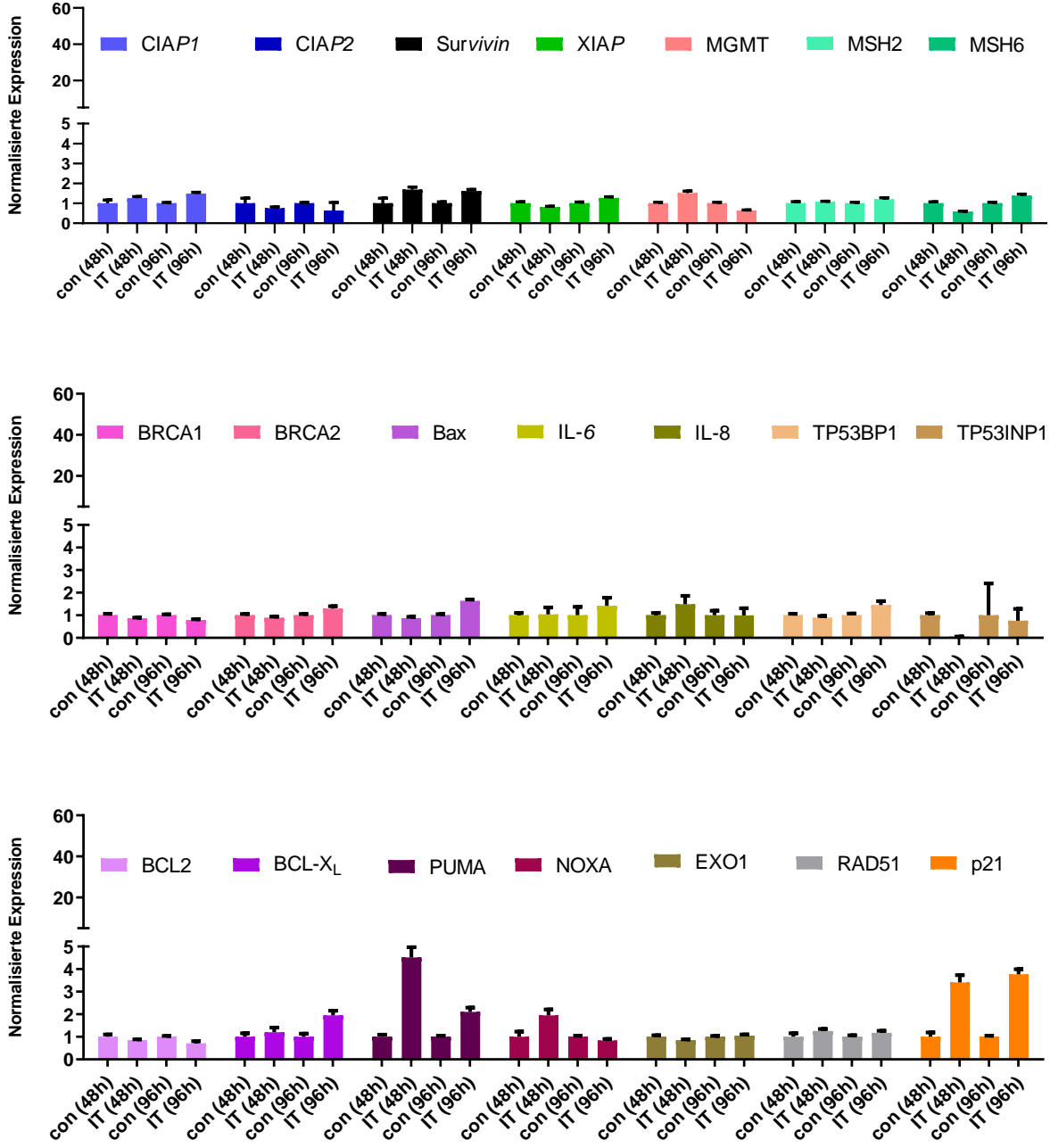


Abbildung 25 qPCR-Analyse spezifischer Genaktivität unter 2.5 µM IT in Zelllinie SW48

Ergebnisse

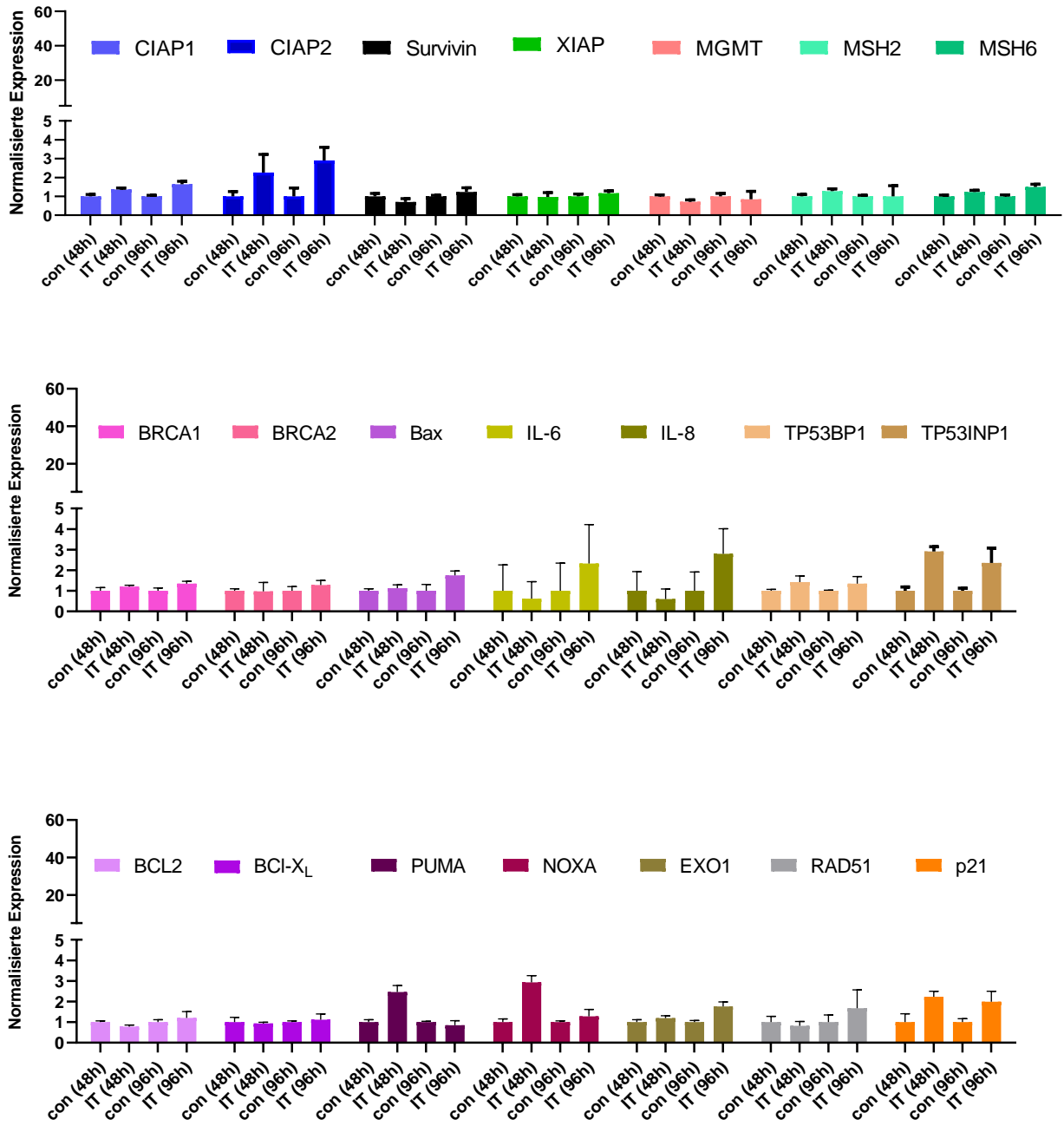


Abbildung 26 qPCR-Analyse spezifischer Genaktivität unter 2.5 µM IT in Zelllinie Surv.GFP C3

Ergebnisse

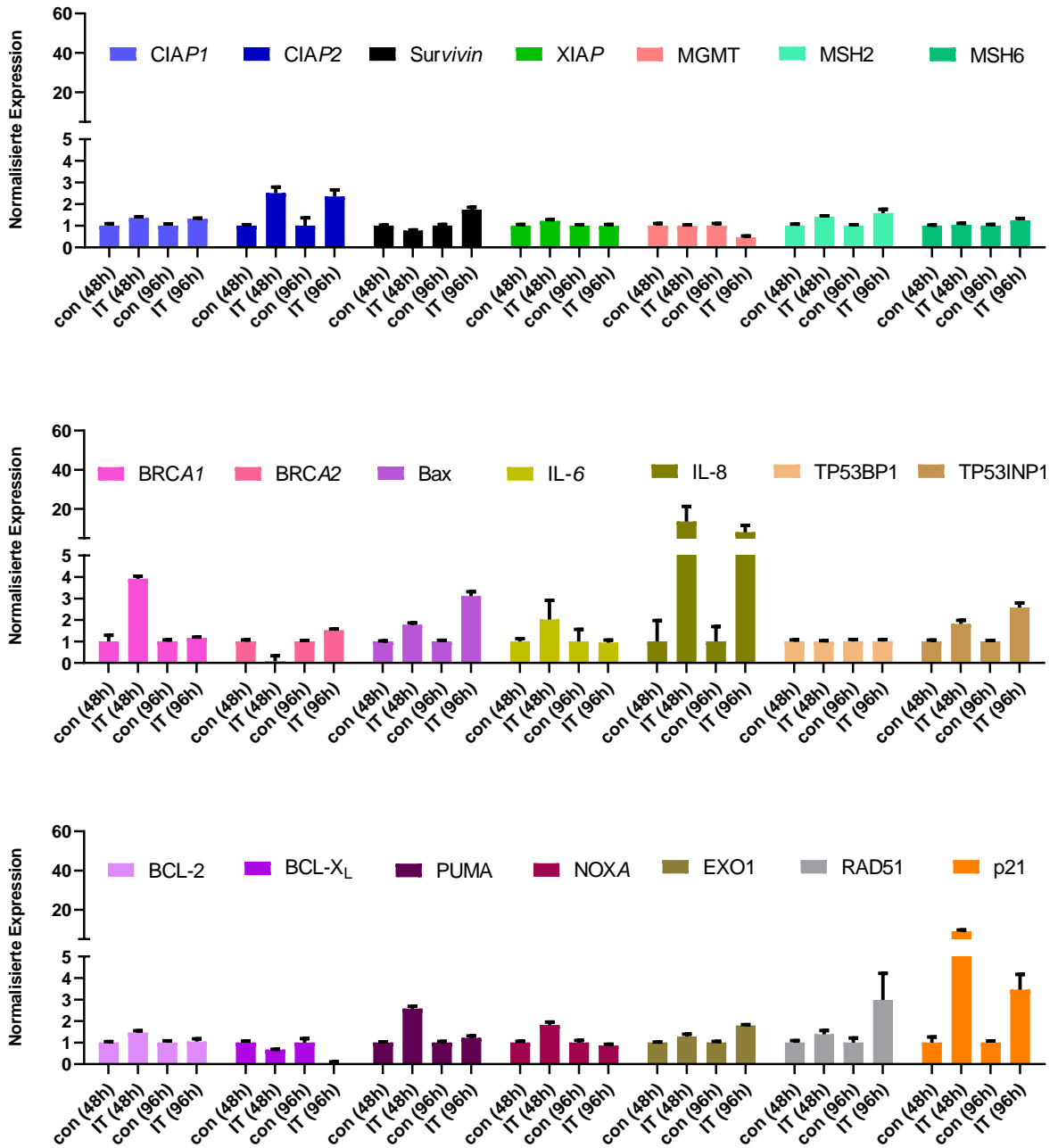


Abbildung 27 qPCR-Analyse spezifischer Genaktivität unter 2.5 µM IT in Zelllinie Surv.NESmut S6

5.1.4 Charakterisierung rekombinanter Zellklone

Im folgenden Westernblot-Versuch wurden die drei verschiedenen Zelllinien überprüft, ob sie das Survivin-GFP-Fusionsprotein exprimieren. Es ist eine deutliche Expression des Survivin-GFP Fusionsproteins bei ca. 43 kDa (Survivin-Anteil 16.5 kDa, GFP-Anteil 27 kDa) und unfusioniertes GFP bei 27 kDa in den beiden Zellklonen (Surv-GFP C3 und SurvNesmut S6) zu sehen, wobei sie in den parental SW48-Zellen komplett ausbleibt. Alle drei Zellvarianten zeigen exprimieren das endogene Survivin.

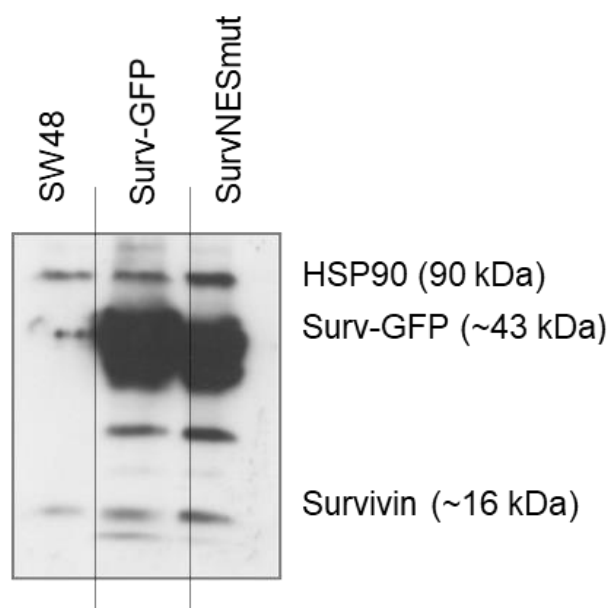


Abbildung 28 **Western Blot Analyse** "Verifizierung des Zellmodells"
HSP90, Ladekontrolle.

5.1.5 Exprimierung des Fusionsprotein

In dem vorliegenden Immunfluoreszenz-Nachweis konnte deutlich nachgewiesen werden, dass in den Zellklonen Lokalisationsunterschiede des Fusionsproteins klar zu sehen sind. Der Surv-GFP Klon hat Survivin sowohl im Cytoplasma (links) als auch im Zellkern (mitte), In dem SurvNESmut Klon hingegen ist Survivin lediglich im Zellkern exprimiert. Der SurvNESmut-GFP Klon weist eine nukleäre Lokalisation auf, wobei der Surv-GFP Klon eine prädominante zytoplasmatische Lokalisation des Fusionsprotein zeigt.

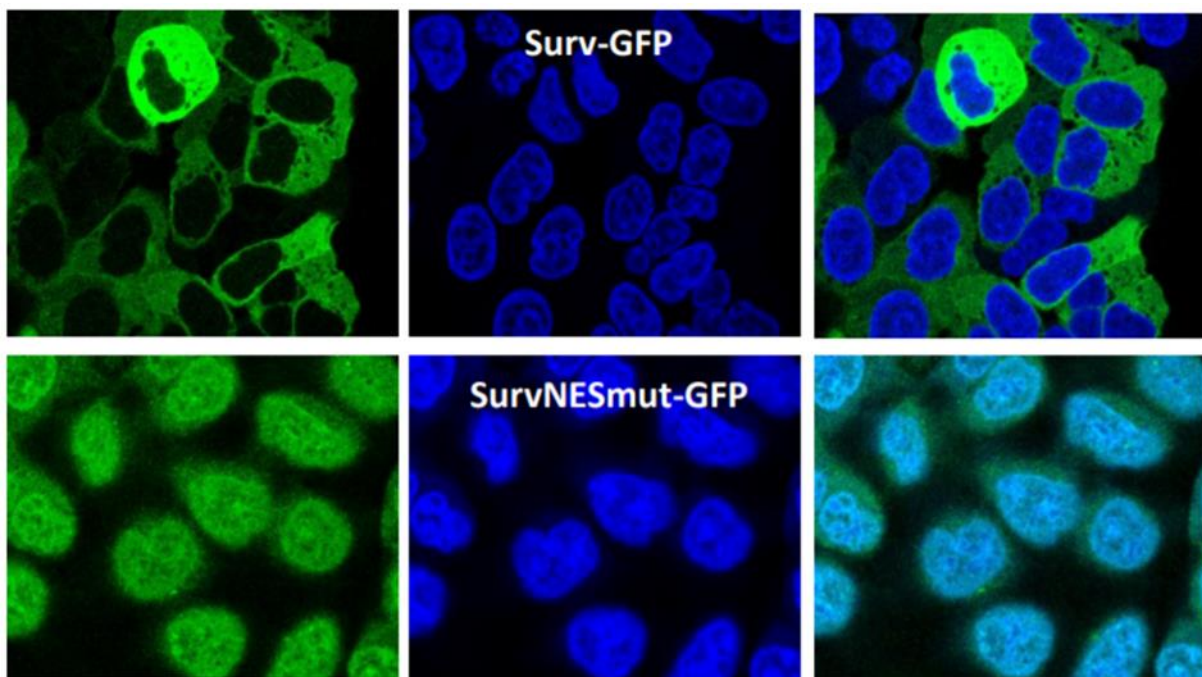


Abbildung 29 **Immunfluoreszenz**
Lokalisation des Fusionsprotein
(Mit freundlicher Genehmigung und zur Veröffentlichung von Prof. Dr. rer. nat. Maja Tomičić-Christmann)

5.1.6 Untersuchung der DNA-schadenabhängigen Antwort (DDR)

Im nächsten Schritt wurde der Unterschied in der *DNA damage response* (DDR) unter der Exposition mit Irinotecan (2.5 μ M) zwischen den parentalen und Survivin-exprimierenden Zellen auf Proteinebene nach 24 h und 48 h überprüft.

Verschiedene Proteine der DDR wurden auf deren Expression nach Irinotecan-Behandlung mittels Western-Blot überprüft. Die phosphorylierte Form des Tumorsuppressors p53, p-p53 (Ser15) war nach früheren Zeitwerten in Surv-GFP Klon besser induziert, nach späteren Zeitwerten waren die Unterschiede in den drei Zellvarianten nicht so deutlich. Eine verstärkte γ H2AX-Expression, dies ein Surrogat-Marker für Induktion von Doppelstrangbrüchen ist, war bei einer Konzentration von 2.5 μ M Irinotecan nach 48 h in allen Zellvarianten deutlich erkennbar. Die Zelllinie Surv-GFP C3 zeigte bei 72 h eine reduzierte Expression des phosphorylierten γ H2AX-Proteins, was darauf hindeutet, dass diese Zellen den Irinotecan-induzierten Schaden (Doppelstrangbrüche) zumindest vorüber gehend besser reparieren können.

Die p21 Expression zeigt die Fähigkeit, bei DNA-Schäden den Zellzyklus anzuhalten. Nach 48 h ist eine deutliche Überexpression von p21 ersichtlich. Weiterhin wird das endogene Survivin in allen Zellvarianten nach Irinotecan-Exposition induziert. Das Fusionsprotein Surv-GFP ist nur in den Zellklonen Surv-GFP C3 und NESmut S6 zu sehen, und bleibt nach allen Zeitwerten unverändert stark exprimiert.

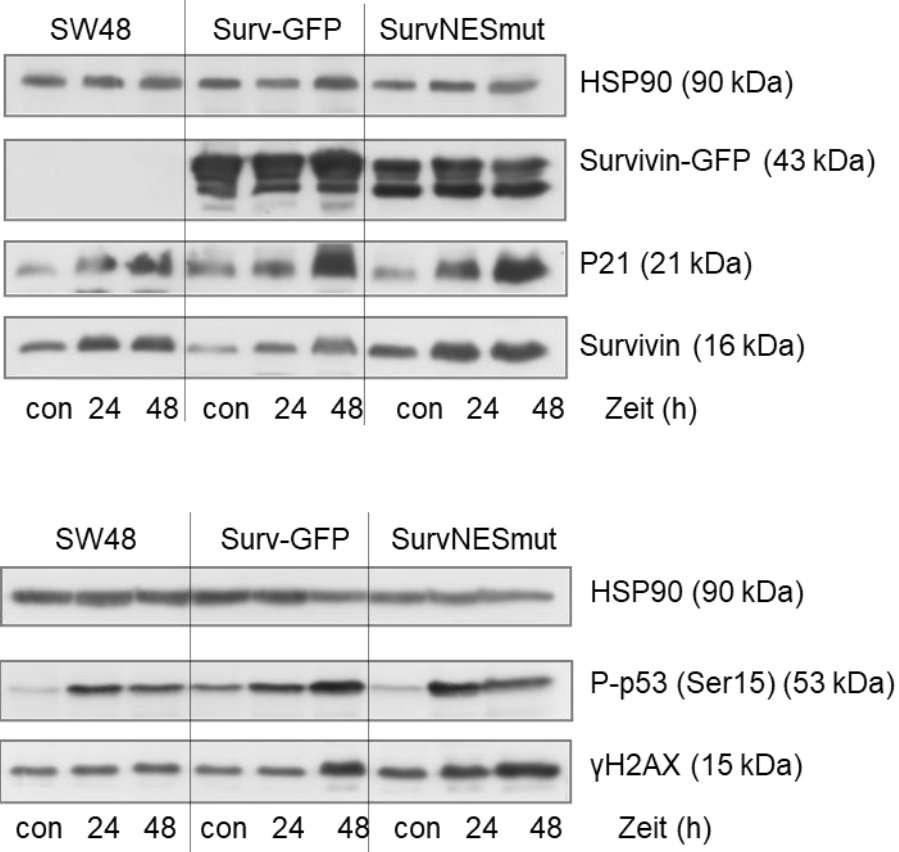


Abbildung 30 **Western Blot Analyse 24h und 48h**
 Mit der Expression von Surv-GFP, p21, Survivin, p-p53 (Ser15) und γH2AX.
 Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 2.5 μM IT für 24h und 48h behandelt. HSP90, Ladekontrolle.

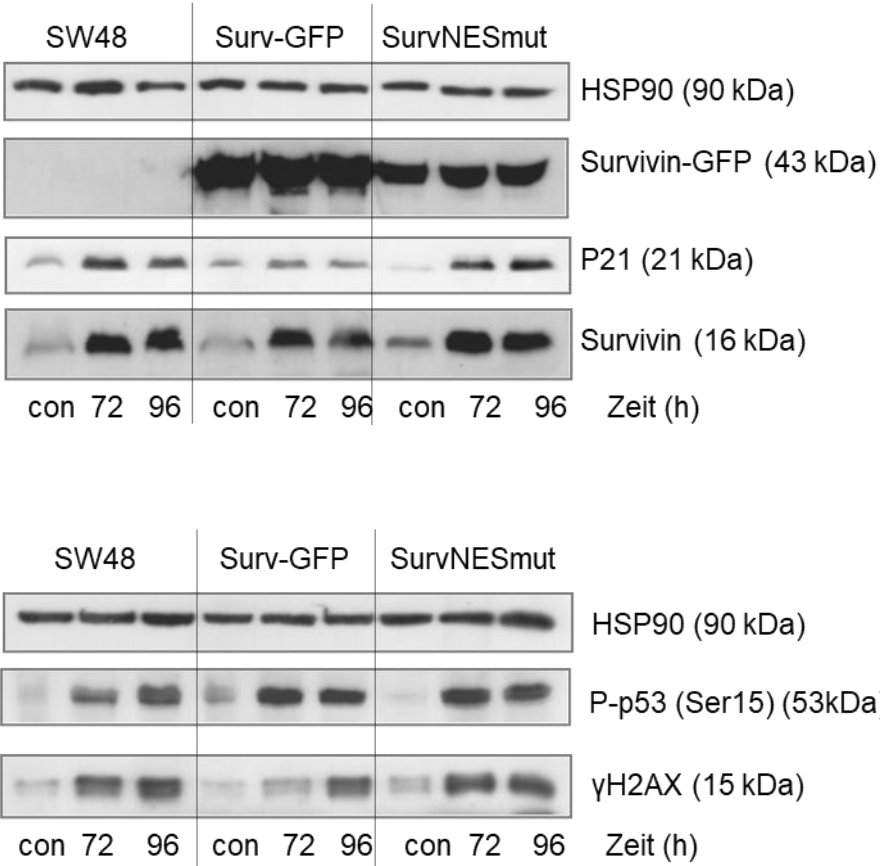


Abbildung 31 **Western Blot Analyse 72h und 96h**
 Mit der Expression von Surv-GFP, p21, Survivin, p-p53 (Ser15) und γH2AX.
 Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 2.5 μM IT für 72h und 96h behandelt. HSP90, Ladekontrolle.

Darüber hinaus wurde die Expression von pro- und anti-apoptotischen Markern mit einer Konzentration von 2.5 μ M Irinotecan nach 72 h und 96 h überprüft. Hierbei wurde deutlich, dass Phospho-Akt (Serin 473) in SW48 Zellen und dem Zellklon Surv-GFP C3 96 h nach Irinotecan-Behandlung signifikant stärker exprimiert wird. Weiterführend wurde die BCL-2 Expression überprüft; hierbei konnte eine höchst wahrscheinlich proteasomale Degradation im NESmut S6 deutlich verzeichnet werden, was auf eine Sensitivität gegenüber der Irinotecan-induzierten Apoptose hinweist. Es konnte eine deutliche Expression von BCL-X_L in SW48 und den Klonen Surv. GFP C3 und NESmut S6 gezeigt werden, welche sich allerdings mit der Zeit der Exposition nicht verändert hat.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit, wurde das Enzym PARP (Poly-(ADP-Ribose-) Polymerase bzw. dessen Spaltprodukt nach 72 h und 96 h Irinotecan-Behandlung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in allen drei Zellvarianten PARP gespalten wird. Hierbei entsteht ein 85 kDA großes Fragment, was auf eine durch die Caspase-3 vermittelte Induktion der Apoptose nach Irinotecan-Exposition hindeutet.

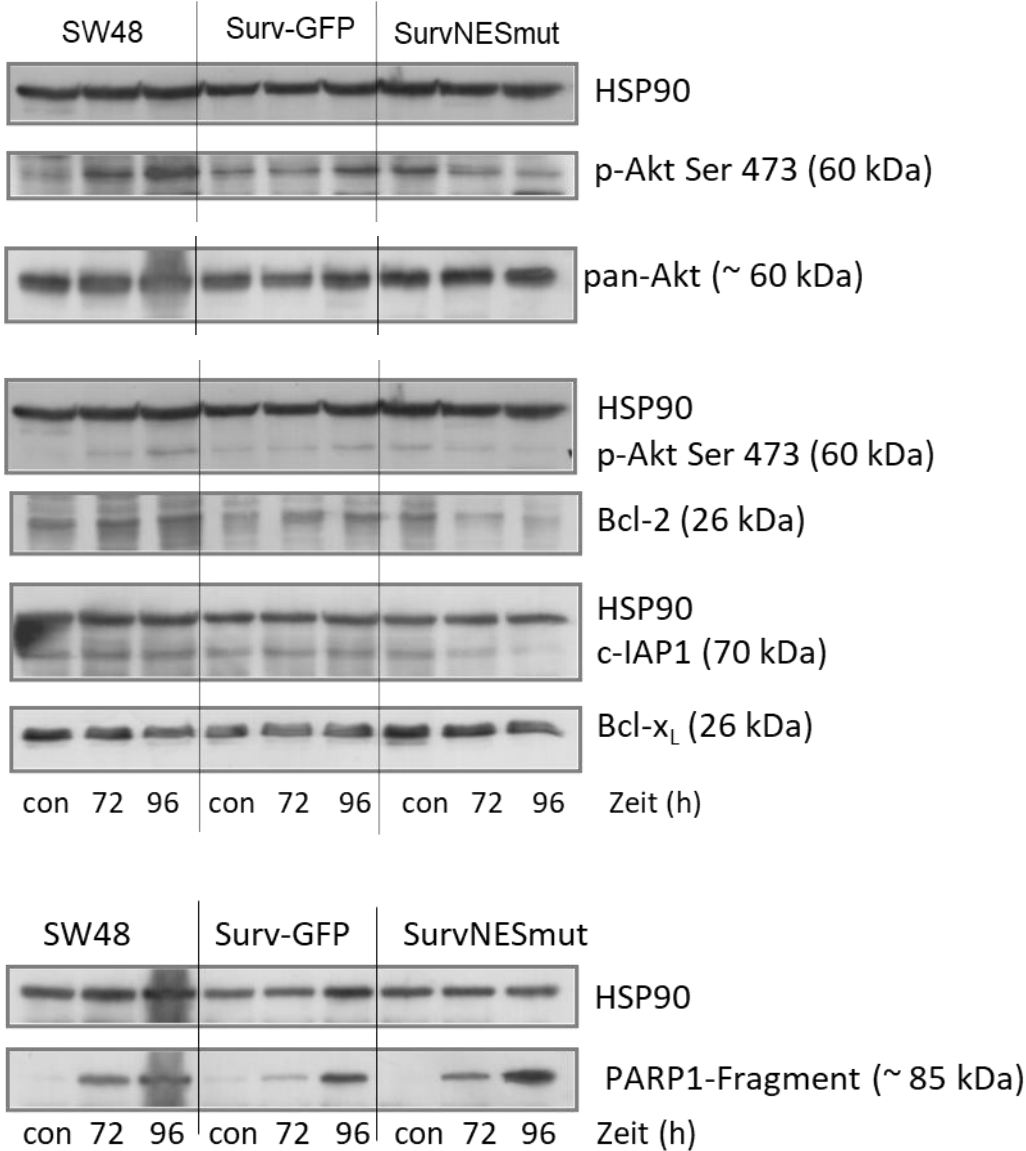


Abbildung 32 **Western Blot Analyse 72h und 96h Pro-/Antiapoptotische Marker**
 Mit der Expression von p-Akt Ser 473, Bcl-2, c-IAP1 und Bcl-x_L, PARP1.
 Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 2.5 µM IT für 72h und 96h behandelt.
 HSP90, Ladekontrolle.

5.1.7 Untersuchung der Replikationsprogression

Um eventuelle Unterschiede in der Replikation zwischen der Zellklonen zu untersuchen, wurde anhand des DNA-Fiber Assays eine qualitative und quantitative Analyse der DNA-Replikation in den parentalen SW48 und den Zellklonen Surv-GFP C3 und den NESmut S6 untersucht. In Anfangsexperimenten wurden die Zellen mit 1 μM Irinotecan behandelt, aber die Großzahl der Versuche wurde mit 2.5 μM Irinotecan durchgeführt, um ein bestimmtes Fortschreiten (Direktionalität) der Replikation zu analysieren.

Eine detaillierte Bewertung der zellulären Reaktionen auf Replikationsstress ermöglichen die ausgewerteten Parameter und liefern aussagekräftige Information, um eine effiziente DNA-Replikation und die Rolle einzelner Proteine in diesem Prozess sicherzustellen (Nieminuszczy et al., 2016).

Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Unterschied innerhalb der 24 h Kontrolle der parentalen Zellen SW48 mit 1.23 CldU kb/min und 1.18 IdU kb/min basiert. Die Behandlung der parentalen Zelllinie SW48 nach 24 h zeigte eine Geschwindigkeit von 0.93 CldU kb/min und 1.12 IdU kb/min auf. Im Vergleich kann also kein signifikanter Unterschied innerhalb der Behandlung mit 1 μM Irinotecan gezeigt werden. Dementsprechend liegt bei der Replikationsprogression kein signifikanter Unterschied vor und zeigt während der S-Phase der Replikation eine untergeordnete Rolle. Weiterführend wurde der DNA-Fiber-Assay aufgrund der Vorarbeiten anhand der minimalen Dosis von 1 μM IT, auf eine moderat toxische Dosis von 2.5 μM IT erhöht.

Bei dieser Dosis zeigten die Zellen nach 24 h eine Geschwindigkeit von 0.72 CldU kb/min und 1.07 IdU kb/min auf. Im Vergleich dazu steht die Kontrolle mit einer Geschwindigkeit von 0.75 CldU kb/min und 0.82 IdU kb/min. Folglich erfolgte die Auswertung des Zellklons Surv.GFP C3. Die Daten liegen hierbei auf 1.07 CldU kb/min und 0.79 IdU kb/min, hingegen ist die Behandlungsgeschwindigkeit, 1.02 CldU kb/min und 0.94 IdU kb/min. Der Zellklon SurvNESmut S6 zeigt 0.82 CldU kb/min und 1.20 IdU kb/min in der Kontrolle auf, die Geschwindigkeit innerhalb der behandelten Zellen ist 1.03 CldU kb/min und 1.24 IdU kb/min (Abbildung 34, Abbildung 35, Abbildung 36).

Die DNA-Faseranalyse zeigt, dass der Unterschied zwischen den behandelten Surv.GFP C3 mit 1.02 CldU kb/min und 0.94 IdU kb/min, sowie Surv.NESmut S6 von

1.03 CldU kb/min und 1.24 IdU kb/min signifikante Unterschiede in der Replikationsgeschwindigkeit aufweisen. In weiteren Experimenten zeigten, sich diese in der Replikationsgeschwindigkeit innerhalb dieser Zelllinien dennoch keine weiteren signifikanten Nachweise.

Der Replikationsstress wurde anhand der verschiedenen DNA-Spuren analysiert. Hierbei sind die unterschiedlichen Typen der Replikationsursprünge zu berücksichtigen. Type 1: 1st pulse ori, zeigt beidseitig laufende Replikationsgabeln mit einem bestimmten Ursprung. Type 2: ongoing, zeigt einseitig laufende Replikationsgabeln und Type 3: stalled, blockierte Replikationsgabeln mit dem Nachweis von CldU. Type 4: termination, hierbei beginnt die Replikationsgabel an den benachbarten Replikationsursprüngen und die DNA- Synthese ist im Genom abgeschlossen. Type 5: 2nd pulse ori=new origin of firing.

Innerhalb der parental Zelllinie SW48, ist in den Anfangsexperimenten kein signifikanter Replikationsursprung des Type 2 ongoing deutlich. Die behandelten Zellen zeigen, dass ca. 30 % in den Type 5 übergehen und somit sind neue Replikationsursprünge ersichtlich (Abbildung 33b).

Die weiterführenden Experimente mit einer moderat toxischen Dosis von 2.5 μ M IT zeigten, dass die behandelten parental Zellen SW48 auf eine 60 % -ige Type 2 basieren. Diese Zellen zeigen eine 5- 20 % -ige Type 3, Type 4 und Type 5.

Surv-GFP C3 Klon (Abb. 35b) und Surv-Nesmut S6 (Abb. 36b) zeigten keinen signifikanten Unterschied im Type 2. Die behandelten Surv-GFP C3- Zellen und SurvNesmut S6 zeigen eine 50 %-ige Termination (Type 4), hierbei beginnen die Replikationsgabeln bereits an den benachbarten Replikationsursprüngen und gehen in den Type 5 mit 25 % einher.

Ergebnisse

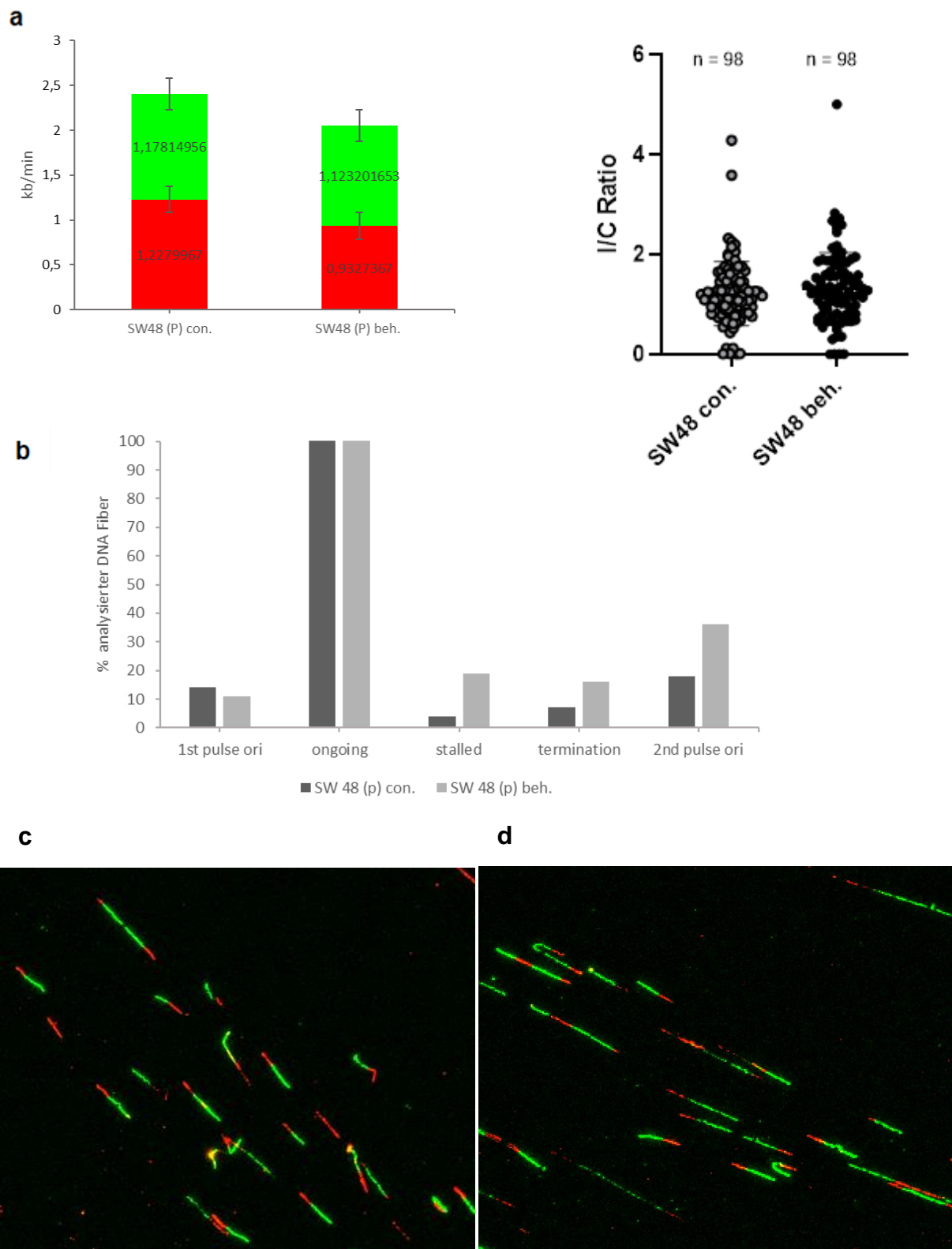


Abbildung 33 DNA-Faseranalyse SW48
 Replikationsprogression innerhalb der con. 24h, bzw. 1 μ M IT nach 24h zur Etablierung der Methode (a)
 Bestimmung der DNA-Faserspur anhand (b),
 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Zelllinie SW 48
 24 h Kontrolle (c), 24 h Behandlung mit 1 μ M IT (d)

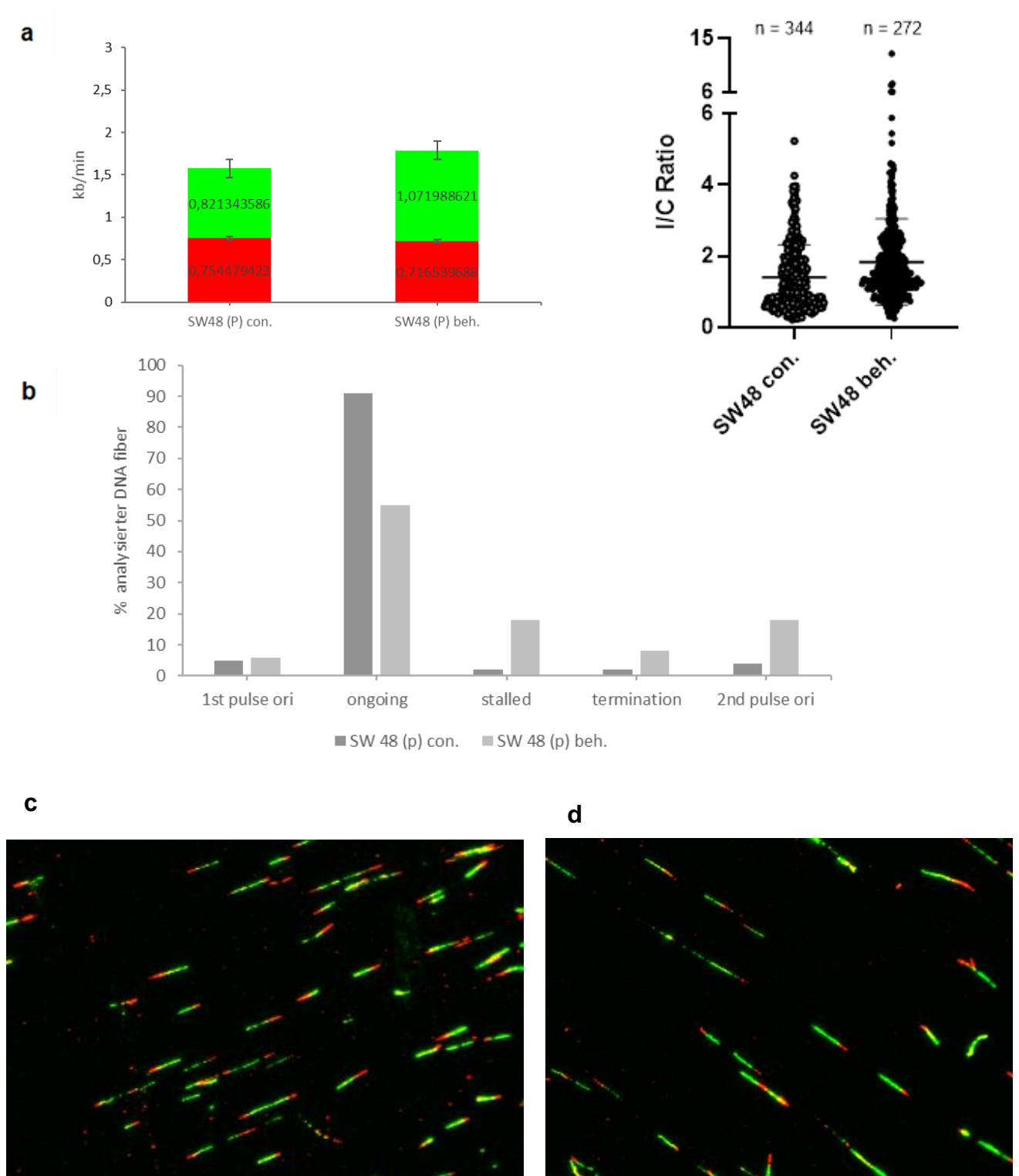


Abbildung 34 **DNA-Faseranalyse SW48** 2.5 μ M IT nach 24h
 Replikationsprogression innerhalb der con. 24h, bzw beh 2.5 μ M IT nach 24h (a)
 Bestimmung der DNA-Faserspur anhand (b),
 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Zelllinie SW 48
 24 h Kontrolle (c), 24 h Behandlung mit 2.5 μ M IT (d)

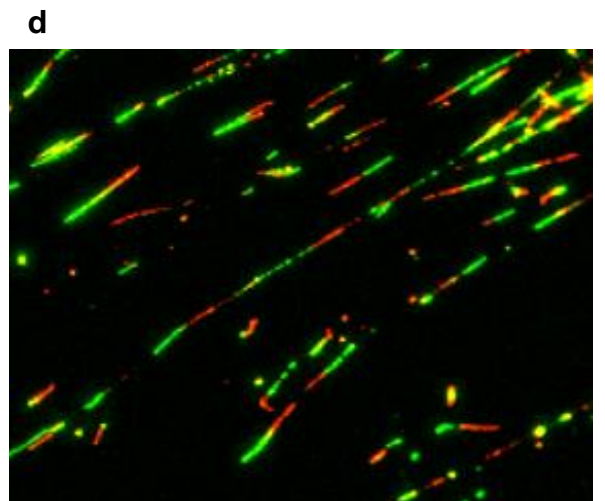
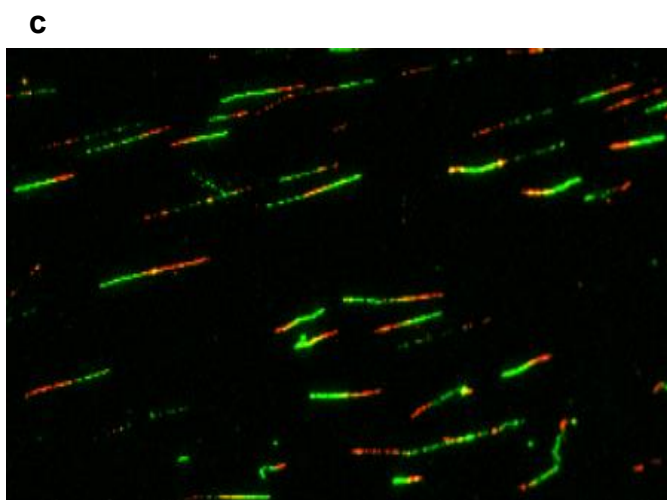
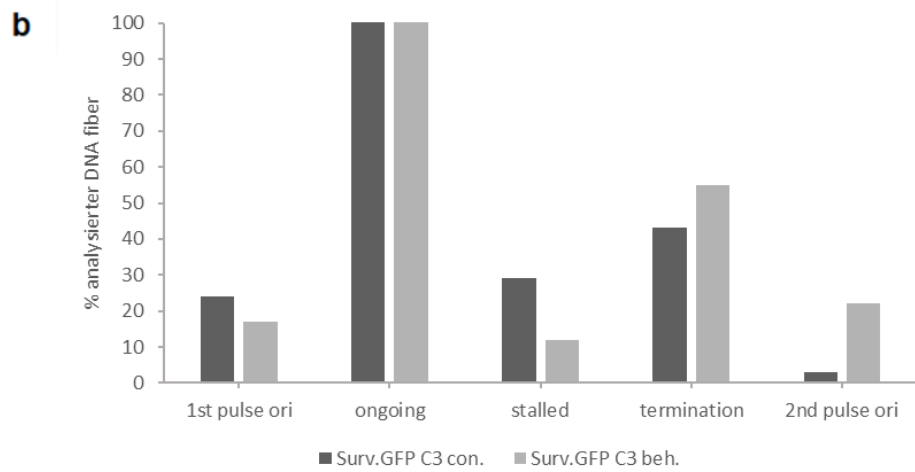
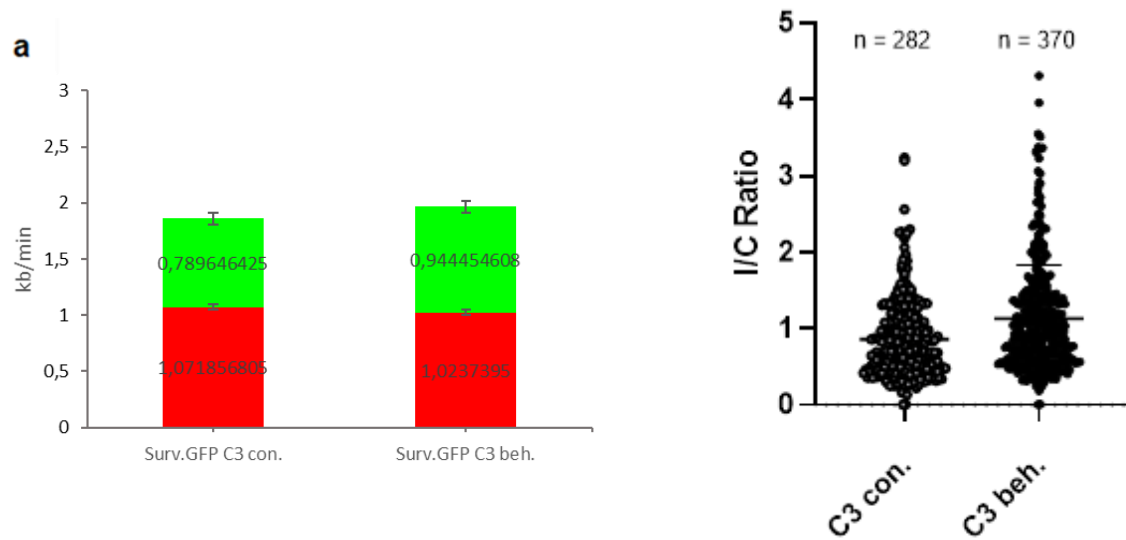


Abbildung 35 **DNA-Faseranalyse Surv.GFP C3** 2.5 µM IT nach 24h
 Replikationsprogression innerhalb der con. 24h, bzw beh 2.5 µM IT nach 24h (a)
 Bestimmung der DNA-Faserspur anhand (b),
 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Zelllinie Surv.GFP C3
 24 h Kontrolle (c), 24 h Behandlung mit 2.5 µM IT (d)

Ergebnisse

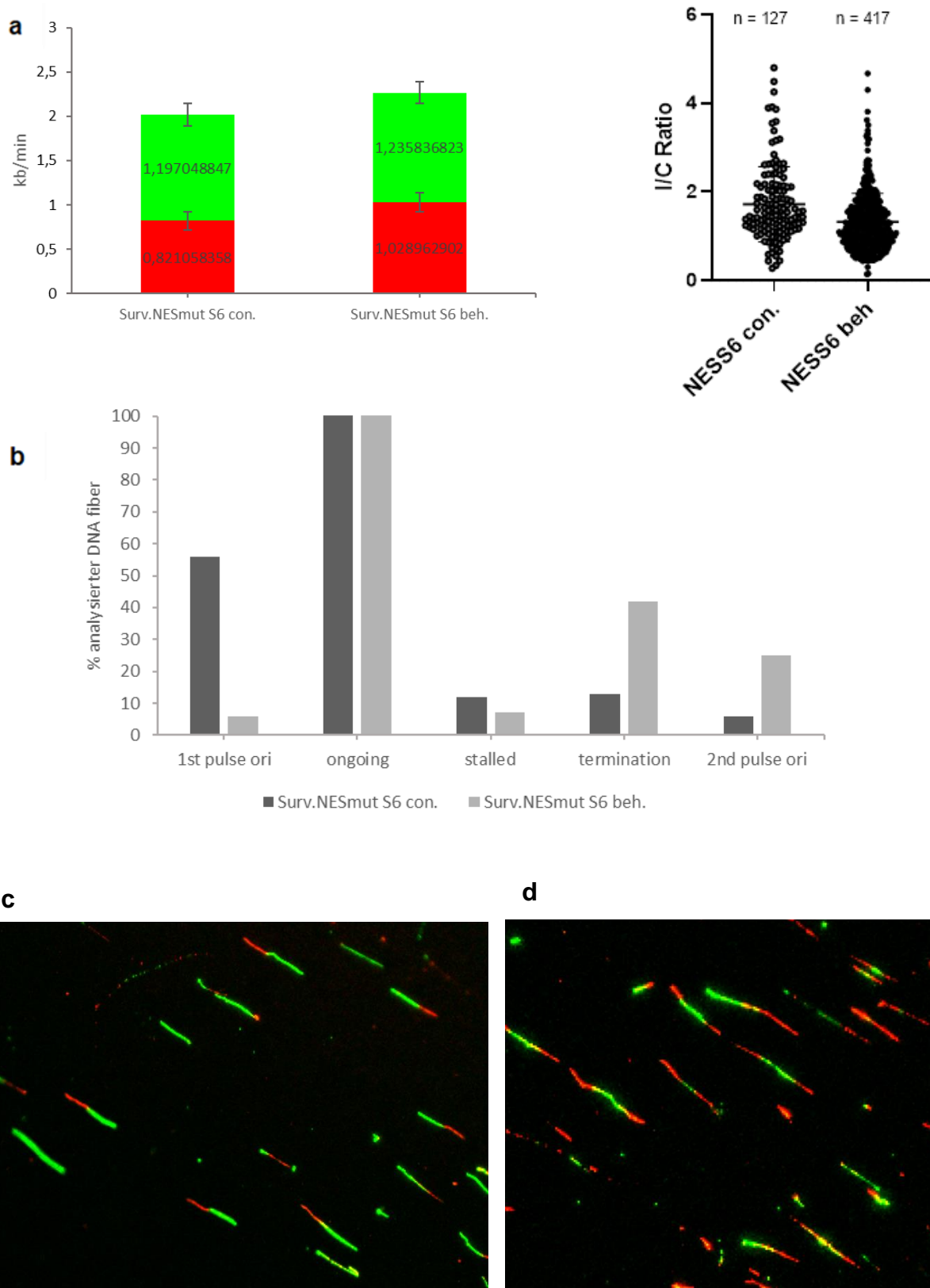


Abbildung 36 **DNA-Faseranalyse NESmut S6** 2.5 μ M IT nach 24h
 Replikationsprogression innerhalb der con. 24h, bzw beh 2.5 μ M IT nach 24h (a)
 Bestimmung der DNA-Faserspur anhand (b),
 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Zelllinie Surv.NESmut S6
 24 h Kontrolle (c), 24 h Behandlung mit 2.5 μ M IT (d)

6 Diskussion

6.1 Diskussion der Ergebnisse

Frühere Ergebnisse aus unserer Forschungsgruppe ergaben, dass die subzelluläre Lokalisierung von Survivin-GFP-Varianten das Überleben von Glioblastomzellen beeinflusst (Reich et al., 2021). Das Survivin reichert sich im Zellkern an und wandert bei genotoxischem Stress hinein. Darüber hinaus ist bekannt, dass Survivin das Überleben durch Inhibierung der Apoptose erhöht, welche im Zytoplasma stattfindet. Es konnte gezeigt werden, dass Temozolomid (TMZ) vermehrt Doppelstrangbrüche sowohl in den SurvNESmut-Klonen und als auch in den Elternzellen nach Survivin-Knockdown induziert, und dass NESmut Zellen vermehrt Polyploidie zeigen und in die Seneszenz gehen. Unterschiedliche Transkriptionsprozesse unter TMZ-Exposition konnten anhand des nukleären versus dem zytoplasmatischen Survivin gezeigt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass zytoplasmatisches Survivin das reproduktive Überleben von Glioblastomzellen verbessert, während die Koloniebildung in den Zellen mit nukleären Survivin signifikant reduziert ist (Reich et al., 2021).

In dieser Arbeit wurde die parentale Zelllinie SW48 transfiziert. Anhand dessen sind zwei Klone mittels eines rekombinanten Plasmids erzeugt worden. SW48 Surv-GFP C3 exprimiert Survivin-GFP überwiegend im Zytoplasma und SW48 NESmut S6 exprimiert das Fusionsprotein aufgrund einer Mutation in der nuklearen export sequenz (NES) vorwiegend im Zellkern, welche verhindert das Survivin aus der Zelle heraus transportiert werden kann, dies zu einer Anreicherung von Survivin im Zellkern führt.

6.1.1 Koloniebildung, Zelltod und Zellzyklusverteilung

Im Koloniebildungsassay (Abbildung 21) ist ersichtlich, dass die parentalen Zellen SW48 mehr Kolonien bilden im Vergleich zum Zellklon SW48 NESmut S6. Der Zellklon Surv-GFP C3 zeigt eine ausgeprägte und signifikant höhere Überlebensrate gegenüber der parentalen SW48 und der NESmut S6 Zellen auf. Die Prozentuale Diversität zeigt auf, dass SW48 mit einer 80 % -igen und SW48 Surv.GFP C3 mit einer 85% -igen Überlebensrate, hingegen zum SW48 Surv.NESmut S6 Klon mit einer 1% -igen Überlebensrate einhergehen. Die C3-Klone scheinen also einen Schutzeffekt gegenüber der Behandlung mit Irinotecan zu besitzen, während die SurvNESmut S6-

Klone wesentlich anfälliger sind. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen bestätigen diese Hypothese.

Die durchflusszytometrische Messung der klonalen Zellen SurvGFP C3 zeigten weniger Zelltod und sind in einen transienten Zellblock übergegangen. Weitergehend konnte anhand der Vorarbeiten aus der Forschungsgruppe durch Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass die nukleäre Lokalisation innerhalb des Surv-NESmut Klon und die zytoplasmatische Lokalisation innerhalb des Surv-GFP Klon, das Fusionsprotein exprimieren. Bei genotoxischen Stress wandert Survivin in den Nucleus und es kommt infolgedessen zur Zellkernanreicherung (Reich et al., 2021). Hinzufügend gehen alle Surv-Klone unter 5 μM IT-Behandlung in einen G1 Arrest.

6.1.2 Ergebnisse der DNA-schadensabhängigen Antwort (DDR)

Die mutmaßlichen Unterschiede in der DDR zwischen den parentalen und Survivin-exprimierenden Zellen konnten unter Exposition mit einer moderat toxischen Irinotecan-Konzentration von 2.5 μM im Zeitintervall von 24 h bis 96 h überprüft werden.

In den bereits erwähnten Western Blot (Abbildung 30) wurde die p-p53 (Ser15) Expression innerhalb der bereits beschriebenen Zelllinien überprüft. Das Tumorsuppressor p53 spielt eine wichtige Rolle bei der zellulären Reaktion auf DNA-Schäden und genomischen Aberrationen. Das phosphorylierte Protein p-p53 (Ser15) ist folgend für die Signalwegeinschaltung im Zellzyklus-Arretierung, in der Apoptose und der DNA-Reparatur zuständig. In dem Western Blot ist ein signifikanter Unterschied in der p-p53 (Ser15) Expression ersichtlich. Innerhalb der 48 h des Surv-GFP Klon, ist p-p53 deutlich mehr induziert als bei den anderen, dies lässt auf einen verstärkten G2/M-Block hindeuten.

In den Zellklonen Surv. GFP C3 und Surv. NESmut S6 sind binnen der ersten 48 Stunden eine deutliche Überexpression von p21 ersichtlich. Dies zeigt, dass p21 die Fähigkeit besitzt, bei den durch Irinotecan induzierten früheren DNA-Schäden den Zellzyklus unabhängig von der Survivin-Zelllokalisierung anzuhalten.

Ein Biomarker für DNA-Doppelstrangbrüche ist γH2AX , dieser ist durch seine Phosphorylierung an der Entstehung der DDR beteiligt, und ist ein Surrogatmarker für Doppelstrangbrüche. Dementsprechend ist eine verstärkte H2AX- Expression bei

einer Konzentration von 2.5 μM Irinotecan nach 48 h deutlich erkennbar. Der Zellklon Surv-GFP C3 zeigt bei einem 72 h-Zeitwert eine Abschwächung des γH2AX -Signals auf, was darauf hindeutet, dass diese Zellen mit den Irinotecan-induzierten DNA-Schäden besser zu Recht kommen. Die γH2AX -Foci in replizierenden Zellen werden durch Irinotecan induziert und zeigen somit das Vorhandensein von DSBs mit den Rückschlüssen auf die vorliegende Replikation (Seiler et al., 2007).

Phospho-Akt (P-Akt) ist ein prognostischer und prädiktiver antiapoptotischer Marker für verschiedene Systeme im Rahmen der Apoptose-Induktion, und spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle, beim Überleben, und beim Umgehen der Apoptose. Hierbei wurde deutlich, dass die Phosphorylierung von Akt an der Stelle Serin 473, welche für die Aktivität entscheidend ist, signifikant mehr in der Zelllinie SW48 und im Klon Surv. GFP C3, wie nach 96 h ersichtlich, stattfindet. Dies lässt vermuten, dass eine Hochregulation der p-AKT(Ser473) - Expression für das bessere Überleben und die Progression der Kolorektalkarzinom-Zellen SW48 und des Surv.GFP C3 Klons mit der zytoplasmatischen Lokalisation von Survivin eine wichtige Rolle spielt.

Die Irinotecan-Behandlung führte zum Abbau des antiapoptotischen BCL-2 Proteins im NESmut S6 Klon, der auf eine Aktivierung des proteasomalen Systems in diesem Zellklon hindeutet, das Ereignis, das zur Intensivierung der Apoptose führt. BCL-2 ist ein Apoptose-regulierendes Protein des mitochondrialen Signalweges. Das BCL-2-Protein und dessen wird weitergehend durch posttranslationale Modifikationen wie Ubiquitinierung und proteasomaler Abbau, oder Caspasen-vermittelte Spaltung reguliert (Azad et al., 2006, Tomicic et al., 2010). BCL-X_L ist auch ein antiapoptotisches Protein aus der Bcl-2-Familie, das sowohl in den parentalen Zellen als auch in den Zellklonen stark exprimiert wurde, dessen Expression sich jedoch nicht mit der verlängerten Irinotecan-Exposition veränderte. Das deutet daraufhin, dass dieses Protein an der Regulation der Irinotecan-induzierten Apoptose in unserem Zellmodell nicht entscheidend beteiligt ist.

Gespaltenes PARP (Poly-(ADP-Ribose-) Polymerase wurde im Western-Blot nach 72 h und 96 h Irinotecan-Behandlung detektiert (Abbildung 32). PARP spielt eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur von Einzelstrangbrüchen, und darüber hinaus ist es an

Transkription, dem Langzeitgedächtnis, dem Altern, dem kardialen Remodeling und der Vasokonstriktion beteiligt (Albadawi et al., 2006, Bürkle et al., 2005, Chiarugi and Moskowitz, 2003, Hernández et al., 2009, Kraus and Lis, 2003, Sung and Ambron, 2004, Xiao et al., 2005, Chaitanya et al., 2010).

6.1.3 Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivität

Um zu analysieren, ob Irinotecan bestimmte Gene in kolorektalen Krebszellen transkriptionell reguliert, wurden die qPCR-Analysen durchgeführt (Abbildung 25, Abbildung 26, Abbildung 27).

Die Daten zeigten eine signifikante Repression von *PUMA* und *p21* in den parentalen Zellen SW48 und eine fehlende transkriptionelle Induktion von *c-IAP2*. Dies könnte bedeuten, dass der Transkriptionsfaktor *NF-κB* an der Regulation von *c-IAP2* nach Irinotecan-Behandlung von kolorektalen Krebszellen möglicherweise nicht beteiligt ist, im Gegenteil zur Tatsache, dass er für die Aufrechterhaltung der TMZ-induzierten Seneszenz eine Rolle spielt (Reich et al., 2021, Aasland et al., 2019). Das würde auch teilweise erklären können, warum die Zellen nicht seneszent werden, sondern in die Apoptose gehen. Die fehlende Seneszenz-Induktion wurde bereits innerhalb der Forschungsgruppe durch die β -Gal-Färbung nachgewiesen. Weitergehend sind innerhalb des Zellklons Surv.GFP C3 die Faktoren *c-IAP2*, *IL-6*, *IL-8*, *PUMA* und *NOXA* signifikant erhöht. Im Vergleich hierzu, zeigt die Zelllinie SurvNES S6 eine starke Repression von *p21*, was auf eine nichtvorhandene Reparatur während der Arretierung von Zellen, und ein Fortschreiten in die Apoptose hindeuten würde. Es liegt nahe, dass unterschiedliche subzelluläre Survivin-Lokalisation auch unterschiedliche Transkriptionsprogramme unter einer Chemotherapie hervorruft, was neulich in TMZ-behandelten Glioblastomzellen gezeigt werden konnte (Reich et al., 2021).

6.1.4 DNA-Fiber Assay

In der vorliegenden Arbeit überprüften wir verschiedene Ansatzmethoden, die zur Herstellung von DNA-Fasern verfügbar sind, und diskutieren dessen Einschränkungen im methodischen Ansatz und dessen Etablierung. Die DNA-Faseranalyse ist in der Dissertation für die genomweite Veränderung der Replikationsgabel-Dynamik hierbei zu untersuchen (Quinet et al., 2017). Wir überprüften auch mittels DNA-Faseranalyse,

wie die Kolorektalkarzinom-Zellen auf Replikationsstress durch Irinotecan reagieren. Die Behandlung mit der jeweiligen Konzentration von Irinotecan erfolgte vor den beiden Markierungspulsen. Die Gabel-Direktionalität und die Replikationsinitiierung werden durch Analoga bestimmt. Zur quantitativen Analyse durch den dualen Ansatz des Labels ermöglicht, die DNA-Synthese in der S-Phase zu analysieren. Beeinflussende Faktoren sind hierbei die fortlaufenden oder blockierten Replikationsstrukturen, Gabel-Terminationen oder die Replikationsursprungsdichte (Schwab and Niedzwiedz, 2011). Weitergehend ist die krebsbedingte Chromosomeninstabilität (CIN) von großer Bedeutung, hierbei wurden Hinweise auf beeinträchtigte Progression der Replikationsgabel und einen erhöhten DNA-Replikationsstress in CIN⁺-Darmkrebszellen (KRK) im Vergleich zu CIN⁻-KRK-Zellen aufgezeigt (Burrell et al., 2013).

6.1.4.1 Optimierung des DNA-Fiber Assay

Es erfolgte eine stets wiederholte Protokolloptimierung. Unter den Aspekten der Inkubation der jeweiligen Impulse und der Denaturierung. Im Hinblick auf die exakte 50-60 %-ige Konfluenz der Zellen und der entsprechenden Arbeitsraumtemperatur.

Aufgrund der unterschiedlichen Proliferationsrate der parentalen und der Zellklone wurde vor jedem Versuch die genaue Zellzahl bestimmt. Im Hinblick auf eine 50- 60% -ige Konfluenz der einzelnen Zellkulturflaschen, bzw. 150.000–300.000 Zellen in 5 ml Kulturmedium, war dies ein äußerst entscheidender Prozess für die erfolgreiche DNA-Faseranalyse. Anschließend erfolgte die Irinotecan-Behandlung vor beiden Markierungsimpulsen (Einbau von CldU und IdU in die DNA). Aufgrund der Diskrepanz wurde die Behandlung mit Irinotecan in einigen Versuchen mit der Impulsmarkierung vorgenommen. Hierbei war kein signifikant verändertes Ergebnis ersichtlich.

Für die Impulsmarkierung fand eine Optimierung der Inkubation von CldU und IdU während der experimentellen Phase statt. Anstatt eine längere Inkubationszeit zu wählen, wurde die optimale Inkubationszeit bei 20-25 Minuten festgelegt. Abweichungen von 1 Minute erhöhen die Markierung um 5 % und verändern die Ergebnisse (Halliwell et al., 2020).

Die DNA-Verbreitung auf den Objektträgern (DNA *spreads*) benötigte eine andauernde Prozessoptimierung. Die Inkubation der Proben lag bei 2-3 Minuten auf dem

Objektträger. Anschließend wurde die Probe mit 10 µl Spreading buffer unter höchster Präzision resuspendiert und anschließend 7 Minuten inkubiert. Eine andere Art der Zelllyse ist, das Pipettieren einer 7 µl Zelllyselösung (200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM EDTA, 0.5 % SDS) und lediglich mit der Pipettenspitze zu vermischen. Nach einer 2 -minütigen Inkubation können diese auf 15 Grad gekippt werden und horizontal zum Trocken gestellt werden (Schwab and Niedzwiedz, 2011). Die Tropfenlaufgeschwindigkeit sollte 5-10 Minuten nicht unterschreiten. So können die Tropfen langsam und gleichmäßig an das Ende des Objektträgers laufen.

Die Immunfluoreszenzfärbung begann mit dem Schritt der Fixierung in Methanol für 2 Minuten und folgend wurden sie über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Anhand des Protokolls nach Schwab et al. und Nieminuszczy et. Al. konnte man direkt mit den weiteren Schritten nach einer 10 -minütigen Fixierung mittels Methanol weiterfahren (Schwab and Niedzwiedz, 2011, Nieminuszczy et al., 2016). Dies ist eine weitere Möglichkeit, die DNA-Faseranalyse zu modifizieren.

Die DNA-Denaturierung wurde hier auf die 2.5 M HCl-Lösung mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:4 angepasst.

Ein weiterer wichtiger Optimierungsschritt war die geeignete Fixierung der Zellen auf den Objektträgern. Durch die unterschiedlichen Ebenen der Fasern auf dem Objektträger bei der Analyse mit dem Fluoreszenzmikroskop folgten einige Versuche mit dem Eindeckmedium Vectashield. Infolgedessen fand der Vergleich zwischen den unterschiedlichen Fixierungen innerhalb der Arbeit statt. Schlussfolgernd dessen konnte eine optimale Prozessierung mittels Mowiol (ein anderes Eindeckmedium) stattfinden und diente zur effektiveren Variante zum Eindecken der Objektträger. Das Eindeckmedium Mowiol wurde anhand Tabelle 2 zusammengestellt.

Die Datenreproduzierbarkeit stellt in diesem Experiment einen wesentlichen Bestandteil, der in sich wiederholten Experimente unter denselben Bedingungen dar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Fasertechniken eine Visualisierung einzelner Replikationsgabeln in Karzinomzellen ermöglicht hat. Hierbei wurden verschiedene Aspekte im Hinblick auf die DNA-Synthese in quantitativer Sicht aufgezeigt. Für das erweiterte Proteinverständnis und dessen Auswirkungen sind mehrere Ansätze und Versuchsdurchführungen

empfehlenswert, um das globale Replikationsprogramm zu erlangen (Nieminuszczy et al., 2016, Schwab et al., 2010, Blackford et al., 2012, Schwab et al., 2013, Clynes et al., 2014).

Der Forschungsaspekt hierfür spricht für einen erweiterten experimentellen Ansatz mittels eines BrdU Zellenproliferations-ELISA, um die S-Phasen-Progression zu untersuchen, sowie weiterführende DNA-Faseranalysen mit der beschriebenen Protokolloptimierung anhand dieser Arbeit.

6.1.4.2 Replikationsprogression

Die Elongationsrate in Kilobasen pro Minute ist für die Replikationsprogression der einzelnen DNA-Fiber ausschlaggebend. Somit kann die Bewegungsgeschwindigkeit aktiver Replikationsgabeln, durch den *in vivo* markierten Einbau der Nukleotide in der DNA verfolgt und ausgewertet werden (Schwab and Niedzwiedz, 2011).

Um die Replikationsprogression zu präzisieren und die genomische Instabilität zu verdeutlichen, könnte man die bidirektionale Markierung mittels CldU und IdU anpassen und weitere Faseranalysen mit unterschiedlichen Irinotecan-Konzentrationen durchführen.

6.1.4.3 Replikationsdynamik

Die weiterführende Replikationsdynamik könnte man mittels der Gabelsymmetrie des synchronisierten Fortschreitens von Schwestergabeln, die von einem einzigen Ursprung ausgehen analysieren. Hierzu könnten die IdU-CldU-IdU-Signale ausgemessen und im Verhältnis zur beider Flächen berechnet werden. Infolgedessen kann man die Quantifizierung zu den Ursprüngen anhand der Gegenfärbung von einem fluoreszierenden Farbstoff wie YOYO-1. Somit können die Messungen einen Nachweis in die Replikationsreaktion auf Proteinverlust oder in den Replikationsstress geben (Halliwell et al., 2020).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verwendete Methode eine Grundlage schafft, um DNA-Schäden in Formen von Doppelstrangbrüchen zu identifizieren und nachzuweisen. Eine zentrale Rolle für den Replikationsstress implizieren die Daten in dieser Arbeit und verdeutlichen die Komplexität des kolorektalen Karzinoms. Der klinische Zustand des kolorektalen Karzinoms zeigt auf, dass es ein am besten charakterisierte Malignom auf molekularer Ebene darstellt. Durch weitergehende

Analysen nimmt das Verständnis dieser heterogenen Erkrankung des KRK zu und bedarf weiterer Evaluationen (Nöpel-Dünnebacke et al., 2021).

7 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom zählt mit 1.9 Millionen Neuerkrankungen und 900.000 Todesfällen im Jahr 2018 zu den weltweit häufigsten Krebsarten (Cardoso et al., 2021, Bray et al., 2018). Aktuellen Studien zufolge ist ein Rückgang bezugnehmend auf die absoluten Fallzahlen und Inzidenzraten deutlich. Dennoch führen fast 60.000 Fälle und 25.000 der Todesfälle pro Jahr in Deutschland auf Darmkrebs zurück (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2015/2016).

Therapeutisch wird Irinotecan als Medikament der ersten Wahl bei einem metastasierenden kolorektalen Karzinom eingesetzt. Dieses Chemotherapeutikum basiert auf einer Beeinflussung und anschließenden Inhibition der Topoisomerase I. Bezugnehmend auf das inhibitorische-Apoptose-Protein Survivin, wurde hierbei die Beeinflussung des biochemischen Mechanismus untersucht. Survivin (BIRC5) ist das kleinste Mitglied der Familie inhibitorischer Apoptose-Proteinen (IAP-Familie) und besitzt eine duale Funktion in der Inhibition der Apoptose und der Zellteilung in der Mitose. Survivin wird in den physiologisch aktiven normalen (nicht-entarteten) Zellen exprimiert, und ist in den meisten Krebsarten überexprimiert. Infolgedessen hat Survivin einen bedeutenden Stellenwert als potenzielles onkotherapeutisches Zielmolekül. Hier sollte eine mutmaßliche Beeinflussung der zellulären Lokalisation von Survivin (Zytoplasma versus Kern) auf die DNA-Schadenantwort (DDR), DNA-Reparatur, Apoptose, und die Replikation unter Exposition mit einem Topoisomerase I-Hemmstoff sowie Irinotecan aufgeklärt werden.

Weitere Untersuchungen sollen zeigen, ob eine Sensitivierung von Survivin - und XIAP- exprimierenden Kolorektalkarzinomzellen durch IAP-Inhibitoren, sowie durch Inhibitoren der DDR und DNA-Reparatur gegenüber Topoisomerase I -Inhibitoren erreicht werden kann.

Die parentale Zelllinie SW48 stammt von einem Patienten mit einem fortgeschrittenem KRK (CRC Dukes TYP IV). Die rekombinante Zellklone wurden vorab durch Transfektion eines Plasmids erzeugt und in dieser Arbeit als SW48 Survivin GFP C3 (exprimiert Survivin-GFP überwiegend im Zytoplasma) und SW48 NESmut S6 (exprimiert überwiegend nukleäres Survivin-GFP Protein, bei dem nukleäre

Exportsequenz ausmutiert wurde). Das klonogene Verhalten gegenüber den parental Zellen, zeigt deutlich, dass das zytosolische Survivin gegenüber dem nukleären Survivin eine höhere Überlebensrate aufweist, wie mittels Koloniebildungstest (*Colony-forming Assay*, CFA).

Weiterhin wurde mittels Western-Blot und Immunfluoreszenz die Funktionalität bzw. die Richtigkeit der rekombinanten Survivin-exprimierenden Zellklone festgestellt; das Surv-GFP und das Surv-NESmut-GFP Fusionsprotein war, im Gegensatz zur parental Zelllinie SW48, in den rekombinanten Zellklonen stark exprimiert.

Das Fortschreiten der Replikation (Replikationskapazität) wurde mittels des DNA-Fiber Assays untersucht, und es konnten Unterschiede zwischen den Zellklonen nachgewiesen werden. Die Expression des nukleären Exportsequenz (NES)-mutierten Survivins (SurvNESmut-GFP) führte zu einer signifikanten Reduktion in der Replikationsprogression.

Die Voraussetzung für die Versuche war eine erfolgreiche Etablierung dieses Verfahrens (DNA-Fiber Assay), welches ein wesentlicher Teil dieser Doktorarbeit ist.

Ferner wurde festgestellt, dass nukleäres Survivin im Gegensatz zum zytoplasmatischen Survivin unterschiedliche Transkriptionsprozesse unter der Behandlung mit Irinotecan aufweist. Daher scheint die subzelluläre Lokalisation von Survivin eine prognostische und therapeutische Relevanz auch hinsichtlich des Kolorektalkarzinoms zu haben. Die Forschung auf dieser biochemischen Ebene zeigt bereits vielversprechende Ansätze in der Onkotherapie. Zunehmend macht die Krebsgrundlagenforschung bemerkenswerte Fortschritte, somit wird auch eine Vielzahl von anderen Krebsarten und auch anderen Krankheiten aufgrund einer Zellzyklus-Modulation und einer Apoptose-Modulation nachvollziehbar und besser verstanden. Diese Prozesse besitzen ein enormes Potential für neue, vielversprechende Therapieansätze.

Abstract

Colorectal cancer, with 1.9 million new cases and 900,000 deaths in 2018, is one of the most common cancers worldwide (Cardoso et al., 2021, Bray et al., 2018). According to recent studies, a decrease is clear with respect to absolute case numbers and incidence rates. Nevertheless, nearly 60,000 cases and 25,000 of deaths per year in Germany are attributed to colorectal cancer.

Therapeutically, irinotecan is used as the first-line drug for metastatic colorectal cancer. This chemotherapeutic agent is based on an interference with and subsequent inhibition of topoisomerase I. Referring to the inhibitory apoptosis protein survivin, the influence of the biochemical mechanism was investigated here. Survivin (BIRC5) is the smallest member of the inhibitory apoptosis protein (IAP) family and has a dual function in inhibiting apoptosis and cell division in mitosis. Survivin is expressed in physiologically active normal (non-degenerate) cells, and is overexpressed in most cancers. As a result, survivin has significant value as a potential oncotherapeutic target. Here, we aimed to elucidate a putative effect of the cellular localization of survivin (cytoplasm versus nucleus) on DNA damage response (DDR), DNA repair, apoptosis, and replication upon exposure to a topoisomerase I inhibitor as well as irinotecan.

Further studies will show whether sensitization of survivin - and XIAP- expressing colorectal carcinoma cells by IAP inhibitors, as well as by inhibitors of DDR and DNA repair to topoisomerase I inhibitors can be achieved.

The parental cell line SW48 was derived from a patient with advanced CRC (CRC Dukes TYPE IV). The recombinant cell clones were generated in advance by transfection of a plasmid and in this work as SW48 survivin GFP C3 (expresses survivin-GFP predominantly in the cytoplasm) and SW48 NESmut S6 (expresses predominantly nuclear survivin-GFP protein where nuclear export sequence was mutated out). The clonogenic behavior towards the parental cells, clearly shows that the cytosolic survivin has a higher survival rate compared to the nuclear survivin, as demonstrated by colony-forming assay (CFA).

Furthermore, Western blot and immunofluorescence were used to determine the functionality and correctness of the recombinant survivin-expressing cell clones, respectively; the Surv-GFP and Surv-NESmut-GFP fusion protein was highly expressed in the recombinant cell clones, in contrast to the parental cell line SW48.

Replication progression (replication capacity) was examined by DNA fiber assay, and differences between cell clones were detected. Expression of nuclear export sequence (NES)-mutated survivin (SurvNESmut-GFP) resulted in a significant reduction in replication progression.

The prerequisite for the experiments was a successful establishment of this procedure (DNA fiber assay), which is an essential part of this PhD thesis.

Furthermore, it was found that nuclear survivin, in contrast to cytoplasmic survivin, exhibits different transcriptional processes upon treatment with irinotecan. Therefore, the subcellular localization of survivin appears to have prognostic and therapeutic relevance also with respect to colorectal cancer. Research at this biochemical level already shows promising approaches in oncotherapy. Increasingly, basic cancer research is making remarkable progress, thus a variety of other cancers and also other diseases are becoming comprehensible and better understood due to cell cycle modulation and apoptosis modulation. These processes have enormous potential for promising new therapeutic approaches.

8 Literaturverzeichnis

- AASLAND, D., GÖTZINGER, L., HAUCK, L., BERTE, N., MEYER, J., EFFENBERGER, M., SCHNEIDER, S., REUBER, E. E., ROOS, W. P. & TOMICIC, M. T. 2019. Temozolomide induces senescence and repression of DNA repair pathways in glioblastoma cells via activation of ATR–CHK1, p21, and NF-κB. *Cancer research*, 79, 99-113.
- ADAMOPOULOS, P. G., TSIAKANIKAS, P., ADAM, E. E. & SCORILAS, A. 2021. Unraveling novel survivin mRNA transcripts in cancer cells using an in-house developed targeted high-throughput sequencing approach. *Genomics*, 113, 573-581.
- ALBADAWI, H., CRAWFORD, R. S., ATKINS, M. D. & WATKINS, M. T. 2006. Role of poly (ADP-ribose) polymerase during vascular reconstruction. *Vascular*, 14, 362-365.
- ALIMUJIANG, M., SUN, J., CHEN, S., BAI, N., CHEN, S., HU, F., MA, J., XU, Y., XU, J. & MA, X. 2022. Survivin is essential for thermogenic program and metabolic homeostasis in mice. *Molecular Metabolism*, 101446.
- ALTIERI, D. C. 2003. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nature Reviews Cancer*, 3, 46-54.
- ALTIERI, D. C. 2006. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Current opinion in cell biology*, 18, 609-615.
- ALTIERI, D. C. Survivin—the inconvenient IAP. *Seminars in cell & developmental biology*, 2015. Elsevier, 91-96.
- AMBROSINI, G., ADIDA, C., SIRUGO, G. & ALTIERI, D. C. 1998. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 11177-11182.
- AZAD, N., VALLYATHAN, V., WANG, L., TANTISHAIYAKUL, V., STEHLIK, C., LEONARD, S. S. & ROJANASAKUL, Y. 2006. S-nitrosylation of Bcl-2 inhibits its ubiquitin-proteasomal degradation: a novel antiapoptotic mechanism that suppresses apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 34124-34134.
- BADRAN, A., YOSHIDA, A., ISHIKAWA, K., GOI, T., YAMAGUCHI, A., UEDA, T. & INUZUKA, M. 2004. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. *Biochemical and biophysical research communications*, 314, 902-907.
- BERARDINI, M., MAZUREK, A. & FISHEL, R. 2000. The effect of O6-methylguanine DNA adducts on the adenosine nucleotide switch functions of hMSH2-hMSH6 and hMSH2-hMSH3. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 27851-27857.
- BLACKFORD, A. N., SCHWAB, R. A., NIEMINUSZCZY, J., DEANS, A. J., WEST, S. C. & NIEDZWIEDZ, W. 2012. The DNA translocase activity of FANCM protects stalled replication forks. *Human molecular genetics*, 21, 2005-2016.
- BRADFORD, S. 1985. Specific subjects. *J. Inf. Sci*, 10, 173-180.
- BRASELMANN, H., MICHNA, A., HEß, J. & UNGER, K. 2015. CFAssay: statistical analysis of the colony formation assay. *Radiation oncology*, 10, 1-6.
- BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A. & JEMAL, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68, 394-424.

- BÜRKLE, A., BRABECK, C., DIEFENBACH, J. & BENEKE, S. 2005. The emerging role of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in longevity. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37, 1043-1053.
- BURRELL, R. A., MCCLELLAND, S. E., ENDESFELDER, D., GROTH, P., WELLER, M.-C., SHAIKH, N., DOMINGO, E., KANU, N., DEWHURST, S. M. & GRONROOS, E. 2013. Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature*, 494, 492-496.
- CALDAS, H., HONSEY, L. E. & ALTURA, R. A. 2005. Survivin 2 α : a novel survivin splice variant expressed in human malignancies. *Molecular cancer*, 4, 1-9.
- CARDOSO, R., ZHU, A., GUO, F., HEISSER, T., HOFFMEISTER, M. & BRENNER, H. 2021. Incidence and Mortality of Proximal and Distal Colorectal Cancer in Germany: Trends in the Era of Screening Colonoscopy. *Deutsches Ärzteblatt International*, 118, 281.
- CHAITANYA, G. V., ALEXANDER, J. S. & BABU, P. P. 2010. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling*, 8, 1-11.
- CHAMPOUX, J. J. 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual review of biochemistry*, 70, 369-413.
- CHEN, Z., NAITO, M., HORI, S., MASHIMA, T., YAMORI, T. & TSURUO, T. 1999. A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 264, 847-854.
- CHIARUGI, A. & MOSKOWITZ, M. A. 2003. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 activity promotes NF- κ B-driven transcription and microglial activation: implication for neurodegenerative disorders. *Journal of neurochemistry*, 85, 306-317.
- CHRISTMANN, M. & KAINA, B. 2013. Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucleic Acids Research*, 41, 8403-8420.
- CHRISTMANN, M., TOMICIC, M. T. & KAINA, B. 2002. Phosphorylation of mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 affecting MutS α mismatch-binding activity. *Nucleic Acids Research*, 30, 1959-1966.
- CHRISTMANN, M., TOMICIC, M. T., ROOS, W. P. & KAINA, B. 2003. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193, 3-34.
- CLYNES, D., JELINSKA, C., XELLA, B., AYYUB, H., TAYLOR, S., MITSON, M., BACHRATI, C. Z., HIGGS, D. R. & GIBBONS, R. J. 2014. ATRX dysfunction induces replication defects in primary mouse cells. *PLoS one*, 9, e92915.
- CUNNINGHAM, D., LANG, I., MARCUELLO, E., LORUSSO, V., OCVIRK, J., SHIN, D. B., JONKER, D., OSBORNE, S., ANDRE, N. & WATERKAMP, D. 2013. Bevacizumab plus capecitabine versus capecitabine alone in elderly patients with previously untreated metastatic colorectal cancer (AVEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *The lancet oncology*, 14, 1077-1085.
- DE ALMAGRO, M. & VUCIC, D. 2012. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Experimental oncology*.
- DEVERAUX, Q. L. & REED, J. C. 1999. IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes & development*, 13, 239-252.
- DIKOMEY J. DAHM-DAPHI I. BRAMMER R. MARTENSEN B. KAINA, E. 1998. Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *International journal of radiation biology*, 73, 269-278.

- DÖRSAM, B., SEIWERT, N., FOERSCH, S., STROH, S., NAGEL, G., BEGALIEW, D., DIEHL, E., KRAUS, A., MCKEAGUE, M., MINNEKER, V., ROUKOS, V., REIßIG, S., WAISMAN, A., MOEHLER, M., STIER, A., MANGERICH, A., DANTZER, F., KAINA, B. & FAHRER, J. 2018. PARP-1 protects against colorectal tumor induction, but promotes inflammation-driven colorectal tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, E4061-E4070.
- DUCKETT, C., NAVA, V. E., GEDRICH, R. W., CLEM, R. J., VAN DONGEN, J. L., GILFILLAN, M. C., SHIELS, H., HARDWICK, J. M. & THOMPSON, C. B. 1996. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *The EMBO journal*, 15, 2685-2694.
- DUFFY, M. J., O'DONOVAN, N., BRENNAN, D. J., GALLAGHER, W. M. & RYAN, B. M. 2007. Survivin: a promising tumor biomarker. *Cancer letters*, 249, 49-60.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35, 495-516.
- ENGELS, K., KNAUER, S., METZLER, D., SIMF, C., STRUSCHKA, O., BIER, C., MANN, W., KOVACS, A. & STAUBER, R. 2007. Dynamic intracellular survivin in oral squamous cell carcinoma: underlying molecular mechanism and potential as an early prognostic marker. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 211, 532-540.
- FADOK, V. A., DE CATHELINEAU, A., HENSON, P. M., BRATTON, D. L. & DALEKE, D. L. 2001. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 1071-1077.
- FISHEL, R. 1998. Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction. *Genes & development*, 12, 2096-2101.
- FISHEL, R., LESCOE, M. K., RAO, M., COPELAND, N. G., JENKINS, N. A., GARBER, J., KANE, M. & KOLODNER, R. 1993. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*, 75, 1027-1038.
- GEIßLER, M. & GRAEVEN, U. 2005. *Das kolorektale Karzinom: Evidenzbasierte Leitlinien*, Georg Thieme Verlag.
- GRADIA, S., ACHARYA, S. & FISHEL, R. 1997. The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. *Cell*, 91, 995-1005.
- GRADIA, S., SUBRAMANIAN, D., WILSON, T., ACHARYA, S., MAKHOV, A., GRIFFITH, J. & FISHEL, R. 1999. hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA. *Molecular cell*, 3, 255-261.
- HALLIWELL, J. A., GRAVELLS, P. & BRYANT, H. E. 2020. DNA Fiber Assay for the Analysis of DNA Replication Progression in Human Pluripotent Stem Cells. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, 54, e115.
- HAUSER, H.-P., BARDROFF, M., PYROWOLAKIS, G. & JENTSCH, S. 1998. A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *The Journal of cell biology*, 141, 1415-1422.
- HEGER, P., LOHMAIER, J., SCHNEIDER, G., SCHWEIMER, K. & STAUBER, R. H. 2001. Qualitative highly divergent nuclear export signals can regulate export by the competition for transport cofactors in vivo. *Traffic*, 2, 544-555.

- HERNÁNDEZ, A. I., WOLK, J., HU, J.-Y., LIU, J., KUROSU, T., SCHWARTZ, J. H. & SCHACHER, S. 2009. Poly-(ADP-ribose) polymerase-1 is necessary for long-term facilitation in *Aplysia*. *Journal of Neuroscience*, 29, 9553-9562.
- HEROLD, G. 2020. Innere Medizin 2021. *Buch*, 426-429, 490-497.
- HÖFFKEN, K., KÖHNE, C.-H., VANHOEFER, U., HOSSFELD, K.-D. & SEEBER, S. 2002; 99. Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms mit 5-FU/ Folsäure und Irinotecan. *Dtsch Arztebl International*, 5, 292-294.
- HOFMANN-ÄßMUS, M. 2022. Update des Darmkrebs-Screenings: US-Behörde für Screening ab 45 Jahren. *Endo*, 38, 6-8.
- HOLM, C., COVEY, J. M., KERRIGAN, D. & POMMIER, Y. 1989. Differential requirement of DNA replication for the cytotoxicity of DNA topoisomerase I and II inhibitors in Chinese hamster DC3F cells. *Cancer research*, 49, 6365-6368.
- HOLMER, C. & KREIS, M. E. 2017. Darmkrebs—das Neueste in Diagnostik und Therapie. *MMW-Fortschritte der Medizin*, 159, 54-62.
- HOLZAPFEL, B. & WICKERT, L. 2007. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit*, 37, 120-126.
- HSIANG, Y.-H., LIHOU, M. G. & LIU, L. F. 1989. Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer research*, 49, 5077-5082.
- HSU, H., XIONG, J. & GOEDDEL, D. V. 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell*, 81, 495-504.
- HURWITZ, H. I., FEHRENBACHER, L., HAINSWORTH, J. D., HEIM, W., BERLIN, J., HOLMGREN, E., HAMBLETON, J., NOVOTNY, W. F. & KABBINAVAR, F. 2005. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23, 3502-3508.
- IGNEY, F. H. & KRAMMER, P. H. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 2, 277-288.
- INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, U. M. 2021.
- IZUMI, T. & MELLON, I. 2016. Base excision repair and nucleotide excision repair. *Genome Stability*. Elsevier.
- JAXEL, C., KOHN, K. W., WANI, M. C., WALL, M. E. & POMMIER, Y. 1989. Structure-activity study of the actions of camptothecin derivatives on mammalian topoisomerase I: evidence for a specific receptor site and a relation to antitumor activity. *Cancer research*, 49, 1465-1469.
- JOHNSON, D. G. & WALKER, C. L. 1999. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39, 295-312.
- JOHNSON, R. D. & JASIN, M. 2000. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *The EMBO journal*, 19, 3398-3407.
- JOPPIEN 1. Auflage 2010. BASICS Experimentelle Doktorarbeit. © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München.
- KAISER, J. 2021. Cancer. In: SHACKELFORD, T. K. & WEEKES-SHACKELFORD, V. A. (eds.) *Encyclopedia of Evolutionary Psychological Science*. Cham: Springer International Publishing.
- KARZINOME, S.-S. N. K. 2017. Die Lage des Primarius zählt. *Dtsch Arztebl*, 114, 20.
- KASOF, G. M. & GOMES, B. C. 2001. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 3238-3246.

- KATAOKA, T., SCHRÖTER, M., HAHNE, M., SCHNEIDER, P., IRMLER, M., THOME, M., FROELICH, C. J. & TSCHOPP, J. 1998. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *The Journal of Immunology*, 161, 3936-3942.
- KAWASAKI, H., ALTIERI, D. C., LU, C.-D., TOYODA, M., TENJO, T. & TANIGAWA, N. 1998. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer research*, 58, 5071-5074.
- KAWATO, Y., AONUMA, M., HIROTA, Y., KUGA, H. & SATO, K. 1991. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer research*, 51, 4187-4191.
- KERR, J. F., WINTERFORD, C. M. & HARMON, B. V. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73, 2013-2026.
- KING, K. & CIDLOWSKI, J. 1998. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annual review of physiology*, 60, 601-617.
- KISCHKEL, F. C., HELLBARDT, S., BEHRMANN, I., GERMER, M., PAWLITA, M., KRAMMER, P. H. & PETER, M. E. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal*, 14, 5579-5588.
- KLICHE, K.-O., CLEMENT, J. & HÖFFKEN, K. 1999. Apoptose. *Der Onkologe*, 5, 891-897.
- KNAUER, S. K., BIER, C., HABTEMICHAEL, N. & STAUBER, R. H. 2006. The Survivin-Crm1 interaction is essential for chromosomal passenger complex localization and function. *EMBO reports*, 7, 1259-1265.
- KNAUER, S. K., KRÄMER, O. H., KNÖSEL, T., ENGELS, K., RÖDEL, F., KOVÁCS, A. F., DIETMAIER, W., KLEIN-HITPASS, L., HABTEMICHAEL, N. & SCHWEITZER, A. 2007. Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin. *The FASEB Journal*, 21, 207-216.
- KRAUS, W. L. & LIS, J. T. 2003. PARP goes transcription. *Cell*, 113, 677-683.
- KROME, S. 2022. Ökonomische Belastung durch kolorektale Karzinome in Europa. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 60, 18-20.
- KURRECK, A., MODEST, D. P., VON EINEM, J. & STINTZING, S. 2021. Systemische Therapie des metastasierten Kolonkarzinoms. *Der Onkologe*, 27, 259-266.
- LEACH, F. S., NICOLAIDES, N. C., PAPADOPOULOS, N., LIU, B., JEN, J., PARSONS, R., PELTOMÄKI, P., SISTONEN, P., AALTONEN, L. A. & NYSTRÖM-LAHTI, M. 1993. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*, 75, 1215-1225.
- LENS, S. M., VADER, G. & MEDEMA, R. H. 2006. The case for Survivin as mitotic regulator. *Current opinion in cell biology*, 18, 616-622.
- LEPPARD, J. B. & CHAMPOUX, J. J. 2005. Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma*, 114, 75-85.
- LI, F., YANG, J., RAMNATH, N., JAVLE, M. M. & TAN, D. 2005. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance? *International journal of cancer*, 114, 509-512.
- LI, T.-K. & LIU, L. F. 2001. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 41, 53-77.
- LINCZ, L. F. 1998. Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death. *Immunology and cell biology*, 76, 1-19.
- LIPS, J. & KAINA, B. 2001. DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts. *Carcinogenesis*, 22, 579-585.

- LISTEN, P., ROY, N., TAMAI, K., LEFEBVRE, C., BAIRD, S., CHERTON-HORVAT, G., FARAHANI, R., MCLEAN, M., MACKENZIE, A. & KORNELUK, R. G. 1996. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*, 379, 349-353.
- LIU, F.-T., NEWLAND, A. C. & JIA, L. 2003. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochemical and biophysical research communications*, 310, 956-962.
- LOCKSLEY, R. M., KILLEEN, N. & LENARDO, M. J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104, 487-501.
- LUTTMANN, W., BRATKE, K., KÜPPER, M. & MYRTEK, D. 2014. *Der Experimentator: Immunologie*, Springer-Verlag.
- MAHMOOD, T. & YANG, P.-C. 2012. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4, 429.
- MAHOTKA, C., WENZEL, M., SPRINGER, E., GABBERT, H. E. & GERHARZ, C. D. 1999. Survivin- Δ Ex3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer research*, 59, 6097-6102.
- MEDILEARN 2018. Allgemeine Zytologie, Zellteilung und Zelltod. 30-41.
- MIYASHITA, T., KRAJEWSKI, S., KRAJEWSKA, M., WANG, H. G., LIN, H., LIEBERMANN, D. A., HOFFMAN, B. & REED, J. C. 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, 9, 1799-1805.
- MODRICH, P. & LAHUE, R. 1996. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annual review of biochemistry*, 65, 101-133.
- MOSKWA, P. 2016. Repair of double-strand breaks by nonhomologous end joining: its components and their function. *Genome Stability*. Elsevier.
- NIEMINUSZCZY, J., SCHWAB, R. A. & NIEDZWIEDZ, W. 2016. The DNA fibre technique—tracking helicases at work. *Methods*, 108, 92-98.
- NIKOLOVA, T., GÖDER, A., PARPLYS, A. & BORGMANN, K. 2017. DNA Fiber Spreading Assay to Test HDACi Effects on DNA and Its Replication. *HDAC/HAT Function Assessment and Inhibitor Development*. Springer.
- NITISS, J. L. 2009a. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature Reviews Cancer*, 9, 327-337.
- NITISS, J. L. 2009b. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 9, 338-350.
- NÖPEL-DÜNNEBACKE, S., CONRADI, L.-C., REINACHER-SCHICK, A. & GHADIMI, M. 2021. Einfluss der Molekularpathologie auf die onkologische Chirurgie des kolorektalen Karzinoms. *Der Chirurg*.
- ODA, E., OHKI, R., MURASAWA, H., NEMOTO, J., SHIBUE, T., YAMASHITA, T., TOKINO, T., TANIGUCHI, T. & TANAKA, N. 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 288, 1053-1058.
- PFEIFFER, P., GOEDECKE, W. & OBE, G. 2000. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, 15, 289-302.
- PHUONG, N. T., HUNG, N. H. & HUY, D. T. 2022. Cytotoxic activity related to survivin mRNA levels by Combretum quadrangulare Kurz extract against liver and breast cancer cells. *HO CHI MINH CITY OPEN UNIVERSITY JOURNAL OF SCIENCE-ENGINEERING AND TECHNOLOGY*, 12.

- POMMIER, Y. 2006. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 6, 789-802.
- POMMIER, Y. 2009. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chemical reviews*, 109, 2894-2902.
- QUINET, A., CARVAJAL-MALDONADO, D., LEMACON, D. & VINDIGNI, A. 2017. DNA fiber analysis: mind the gap! *Methods in enzymology*, 591, 55-82.
- REICH, T. R., SCHWARZENBACH, C., VILAR, J. B., UNGER, S., MÜHLHÄUSLER, F., NIKOLOVA, T., POPLAWSKI, A., BAYMAZ, H. I., BELI, P. & CHRISTMANN, M. 2021. Localization matters: nuclear-trapped Survivin sensitizes glioblastoma cells to temozolomide by elevating cellular senescence and impairing homologous recombination. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1-18.
- RENEHAN, A. G., EGGER, M., SAUNDERS, M. P. & T O'DWYER, S. 2002. Impact on survival of intensive follow up after curative resection for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Bmj*, 324, 813.
- ROBERT KOCH-INSTITUT UND DIE GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V. , Z. F. K. 2015/2016. Krebs in Deutschland. <https://www.gekid.de/>, 12. Ausgabe.
- ROTHER, M., PAN, M.-G., HENZEL, W. J., AYRES, T. M. & GOEDEL, D. V. 1995. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell*, 83, 1243-1252.
- ROY, N., MAHADEVAN, M. S., MCLEAN, M., SHUTTER, G., YARAGHI, Z., FARAHANI, R., BAIRD, S., BESNER-JOHNSTON, A., LEFEBVRE, C. & KANG, X. 1995. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell*, 80, 167-178.
- ROYER, H.-D., GRINSTEIN, E. & JANZ, M. 1999. Regulation des Zellzyklus und therapeutische Implikationen. *Der Onkologe*, 5, 884-890.
- SALTZ, L. B., CLARKE, S., DÍAZ-RUBIO, E., SCHEITHAUER, W., FIGER, A., WONG, R., KOSKI, S., LICHINITSER, M., YANG, T.-S. & RIVERA, F. 2008. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *Journal of clinical oncology*, 26, 2013-2019.
- SALTZ, L. B., COX, J. V., BLANKE, C., ROSEN, L. S., FEHRENBACHER, L., MOORE, M. J., MAROUN, J. A., ACKLAND, S. P., LOCKER, P. K. & PIROTTA, N. 2000. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 343, 905-914.
- SCAFFIDI, C., SCHMITZ, I., KRAMMER, P. H. & PETER, M. E. 1999. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 1541-1548.
- SCHIMMER, A. D. 2004. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer research*, 64, 7183-7190.
- SCHMIEGEL, W., POX, C., ADLER, G., FLEIG, W., FÖLSCH, U., FRÜHMORGEN, P., GRAEVEN, U., HOHENBERGER, W., HOLSTEGE, A. & JUNGINGER, T. 2004. S3-Leitlinienkonferenz „Kolorektales Karzinom“ 2004. *Z Gastroenterol*, 42, 1129-77.
- SCHMOLL, D. A., A. LANG, U. GRAEVEN 2007. Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms. *Onkodin*.
- SCHNEIDER, A. & CASPARY, W. 2003. Diagnostik kolorektaler Karzinome. *Der Radiologe*, 43, 105-112.

- SCHWAB, R. A., BLACKFORD, A. N. & NIEDZWIEDZ, W. 2010. ATR activation and replication fork restart are defective in FANCM-deficient cells. *The EMBO journal*, 29, 806-818.
- SCHWAB, R. A. & NIEDZWIEDZ, W. 2011. Visualization of DNA replication in the vertebrate model system DT40 using the DNA fiber technique. *Journal of visualized experiments: JoVE*.
- SCHWAB, R. A., NIEMINUSZCZY, J., SHIN-YA, K. & NIEDZWIEDZ, W. 2013. FANCI couples replication past natural fork barriers with maintenance of chromatin structure. *Journal of Cell Biology*, 201, 33-48.
- SEILER, J. A., CONTI, C., SYED, A., ALADJEM, M. I. & POMMIER, Y. 2007. The intra-S-phase checkpoint affects both DNA replication initiation and elongation: single-cell and-DNA fiber analyses. *Molecular and cellular biology*, 27, 5806-5818.
- SRINIVASULA, S. M. & ASHWELL, J. D. 2008. IAPs: what's in a name? *Molecular cell*, 30, 123-135.
- STAUBER, R. H., MANN, W. & KNAUER, S. K. 2007. Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential. *Cancer Research*, 67, 5999-6002.
- STEIGERWALD, C., RASENBERGER, B., CHRISTMANN, M. & TOMICIC, M. T. 2018. Sensitization of colorectal cancer cells to irinotecan by the Survivin inhibitor LLP3 depends on XAF1 proficiency in the context of mutated p53. *Arch Toxicol*, 92, 2645-2648.
- SUNG, Y. J. & AMBRON, R. T. 2004. PolyADP-ribose polymerase-1 (PARP-1) and the evolution of learning and memory. *Bioessays*, 26, 1268-1271.
- SUWAKI, N., KLARE, K. & TARSOUNAS, M. RAD51 paralogs: roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, 2011. Elsevier, 898-905.
- TAKATA, M., SASAKI, M. S., SONODA, E., FUKUSHIMA, T., MORRISON, C., ALBALA, J. S., SWAGEMAKERS, S. M., KANAAR, R., THOMPSON, L. H. & TAKEDA, S. 2000. The Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombinational repair. *Molecular and cellular biology*, 20, 6476-6482.
- TAKATA, M., SASAKI, M. S., SONODA, E., MORRISON, C., HASHIMOTO, M., UTSUMI, H., YAMAGUCHI-IWAI, Y., SHINOHARA, A. & TAKEDA, S. 1998. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO journal*, 17, 5497-5508.
- THOMAS, C. J., RAHIER, N. J. & HECHT, S. M. 2004. Camptothecin: current perspectives. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12, 1585-1604.
- THOMAS, D. C., ROBERTS, J. & KUNKEL, T. 1991. Heteroduplex repair in extracts of human HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 3744-3751.
- TOMICIC, M. T., CHRISTMANN, M. & KAINA, B. 2010. Topotecan triggers apoptosis in p53-deficient cells by forcing degradation of XIAP and survivin thereby activating caspase-3-mediated Bid cleavage. *J Pharmacol Exp Ther*, 332, 316-25.
- TOMICIC, M. T. & KAINA, B. 2013. Topoisomerase degradation, DSB repair, p53 and IAPs in cancer cell resistance to camptothecin-like topoisomerase I inhibitors. *Biochim Biophys Acta*, 1835, 11-27.
- TOMICIC, M. T., STEIGERWALD, C., RASENBERGER, B., BROZOVIC, A. & CHRISTMANN, M. 2019. Functional mismatch repair and inactive p53 drive

-
- sensitization of colorectal cancer cells to irinotecan via the IAP antagonist BV6. *Archives of Toxicology*, 93, 2265-2277.
- UNRUHE, B., SCHRÖDER, E., WÜNSCH, D. & KNAUER, S. K. 2016. An old flame never dies: survivin in cancer and cellular senescence. *Gerontology*, 62, 173-181.
- UREN, A. G., PAKUSCH, M., HAWKINS, C. J., PULS, K. L. & VAUX, D. L. 1996. Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 4974-4978.
- V. HEINEMANN, J. E., C. GIESSEN, M. GROSS, A. KLEESPIES, F. KOLLIGS, R. KOPP, G. MICHL, D. MODEST, J. NEUMANN, A. SCHALHORN, S. STINTZING 2013. Kolonkarzinom. *MANUAL Gastrointestinale Tumore*, 164-211.
- VUCIC, D., STENNICKE, H. R., PISABARRO, M. T., SALVESEN, G. S. & DIXIT, V. M. 2000. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Current biology*, 10, 1359-1366.
- WAJANT, H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, 296, 1635-1636.
- WANG, J. C. 1985. DNA topoisomerases. *Annual review of biochemistry*, 54, 665-697.
- WANG, J. C. 2002. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature reviews Molecular cell biology*, 3, 430-440.
- WANG, Z., LI, Y., LIU, M., CHEN, D., LU, J., JI, Y., ZHOU, X. & WANG, Y. 2022. 3BDO inhibits the proliferation, epithelial-mesenchymal transition (EMT), and stemness via suppressing survivin in human glioblastoma cells. *Journal of Cancer*, 13, 1203.
- WEIS, K. 2003. Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, 112, 441-451.
- WHEATLEY, S. P. & ALTIERI, D. C. 2019. Survivin at a glance. *Journal of Cell Science*, 132, jcs223826.
- WIEN, U. F. B. Oktober 2006. SDS-Page-Elektrophorese. *Transkript*.
- WOOD, R. D., MITCHELL, M., SGOUROS, J. & LINDAHL, T. 2001. Human DNA repair genes. *Science*, 291, 1284-1289.
- WYLLIE, A., KERR, J. R. & CURRIE, A. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology*, 68, 251-306.
- XIAO, C.-Y., CHEN, M., ZSENGELLÉR, Z., LI, H., KISS, L., KOLLAI, M. & SZABO, C. 2005. Poly (ADP-Ribose) polymerase promotes cardiac remodeling, contractile failure, and translocation of apoptosis-inducing factor in a murine experimental model of aortic banding and heart failure. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312, 891-898.
- ZHAO, L., XU, J., ZHAO, W., SUNG, P. & WANG, H.-W. 2018. Determining the RAD51-DNA nucleoprotein filament structure and function by cryo-electron microscopy. *Methods in enzymology*, 600, 179-199.



Anhang

Anhang 1: Tabelle 24 **TNM-Klassifikation des kolorektales Karzinoms**

((modifiziert nach (Herold, 2020))

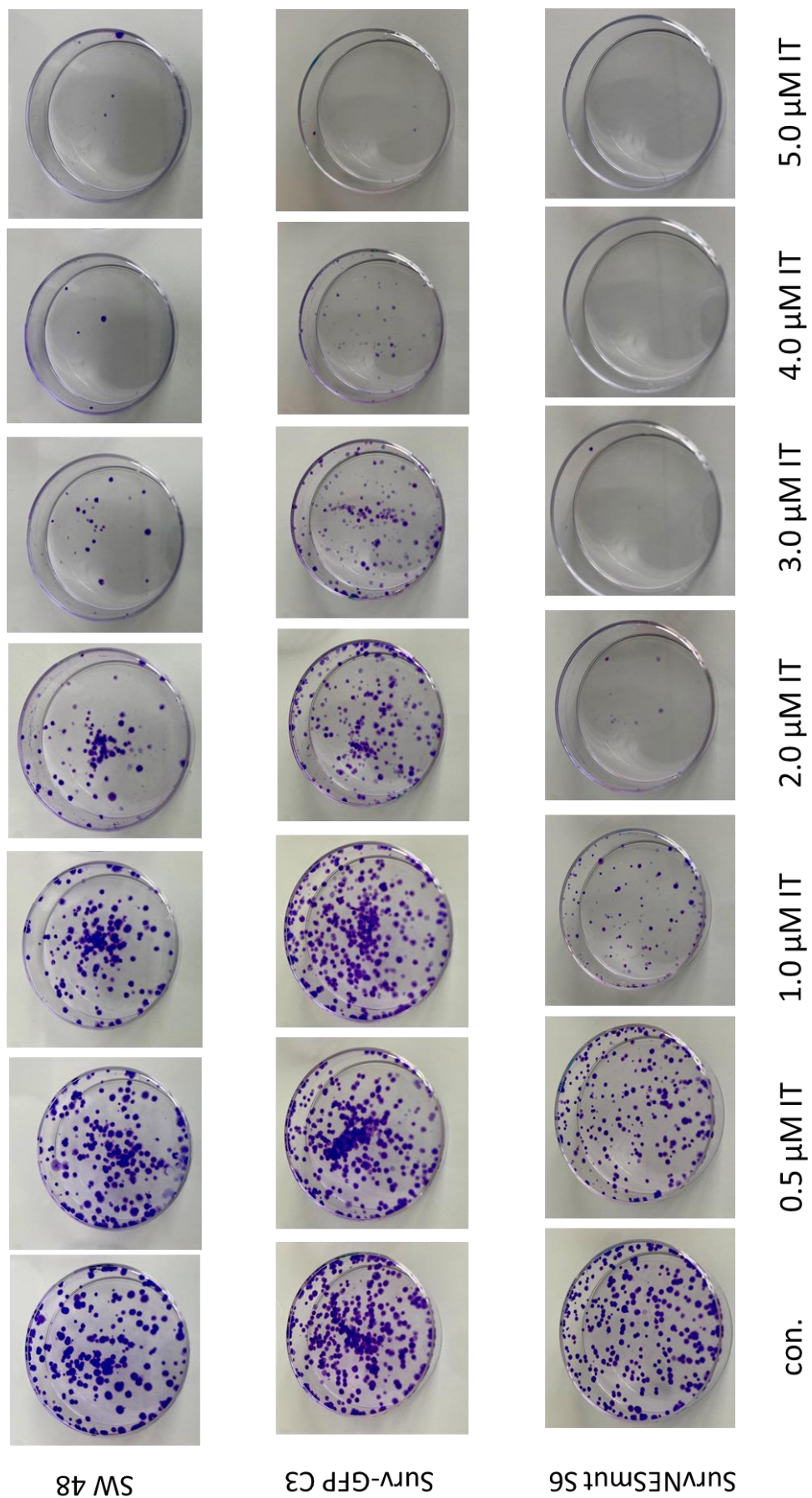
T: Tumorausdehnung, N: Lymphknoten, M: Metastasen

T	Tis	Carcinoma in situ
	T1	Invasion Submukosa
	T2	Invasion Muscularis propria
	T3	Invasion Subserosa
	T4a	Perforation des viszeralen Peritoneums
	T4b	Invasion in andere Organe oder Strukturen
N	N0	Keine regionären Lymphknoten-Metastasen
	N1a	Befall von 1 Lymphknoten
	N1b	Befall von 2-3 Lymphknoten
	N1c	Tumorknötchen im Fettgewebe der Subserosa oder perikolischen/-rektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknoten
	N2a	Befall von 4-6 Lymphknoten
	N2b	Befall \geq 7 Lymphknoten
M	M0	Keine Fernmetastasen
	M1a	Nachweis von Fernmetastasen in 1 Organ
	M1b	Nachweis von Fernmetastasen in mehr als 1 Organ oder im Peritoneum

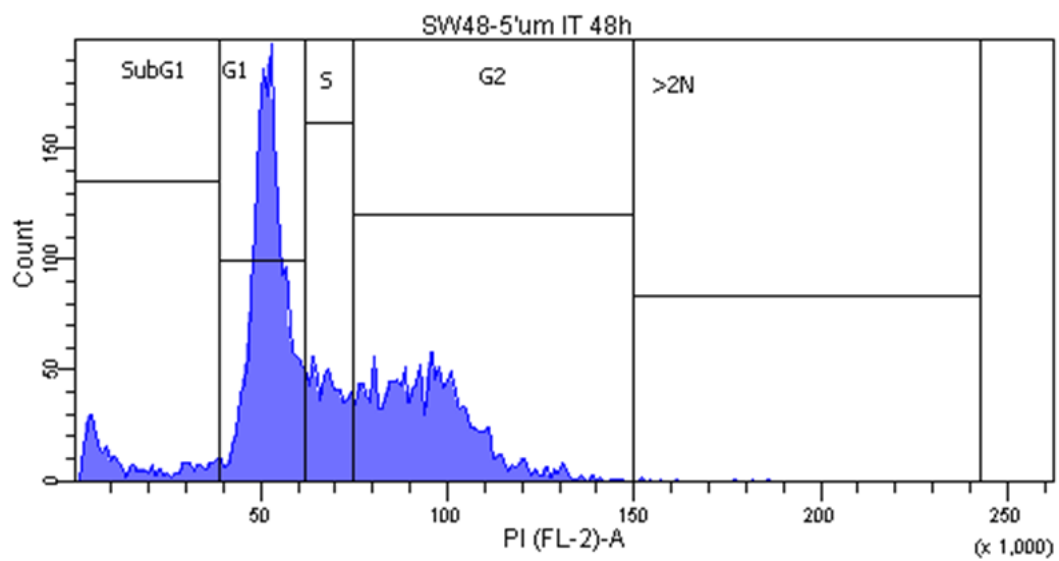
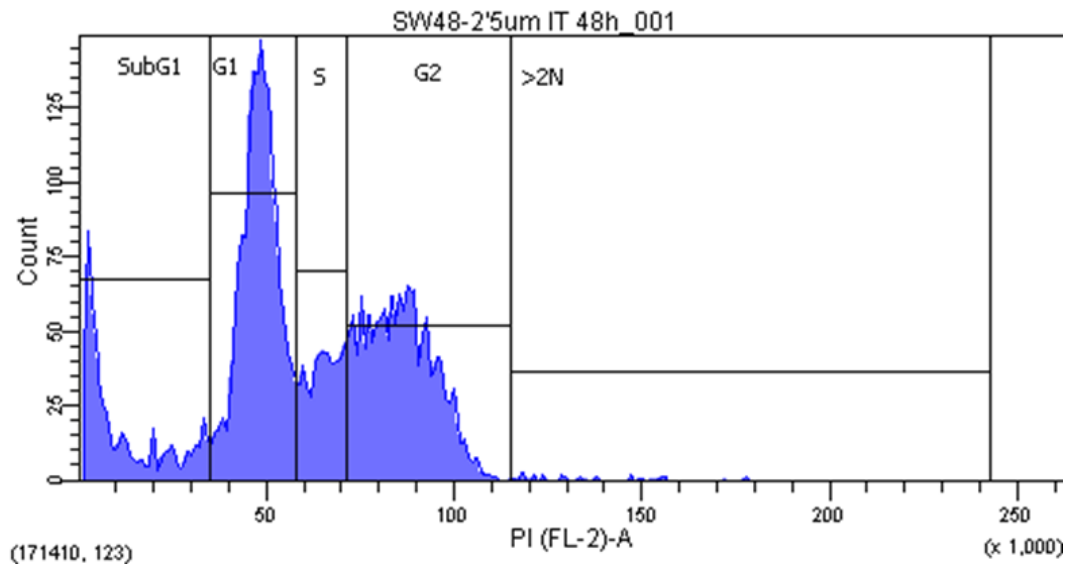
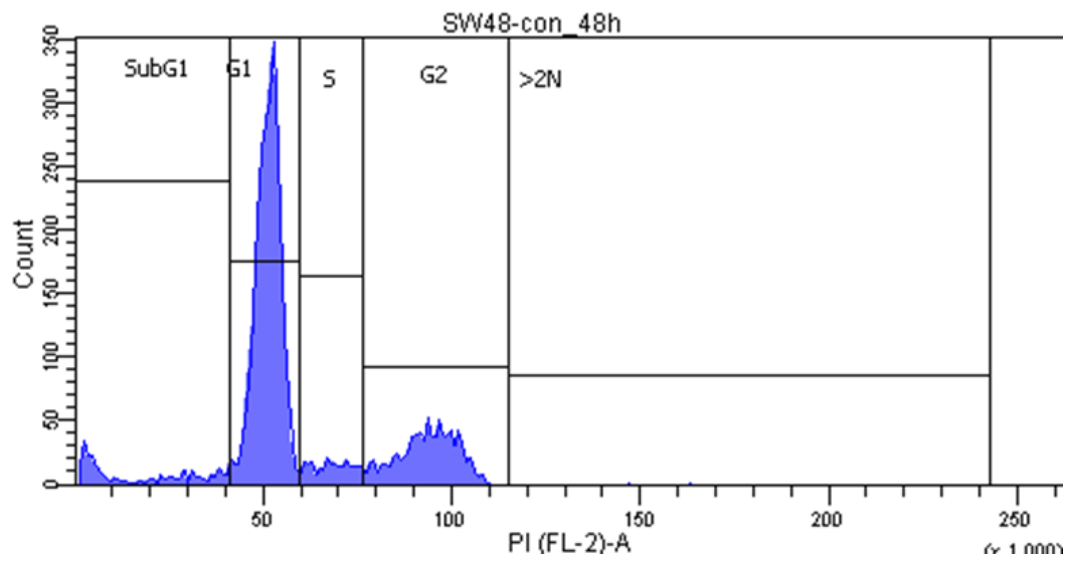
Anhang 2: Tabelle 25 **UICC-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms**
 ((modifiziert nach (Herold, 2020))

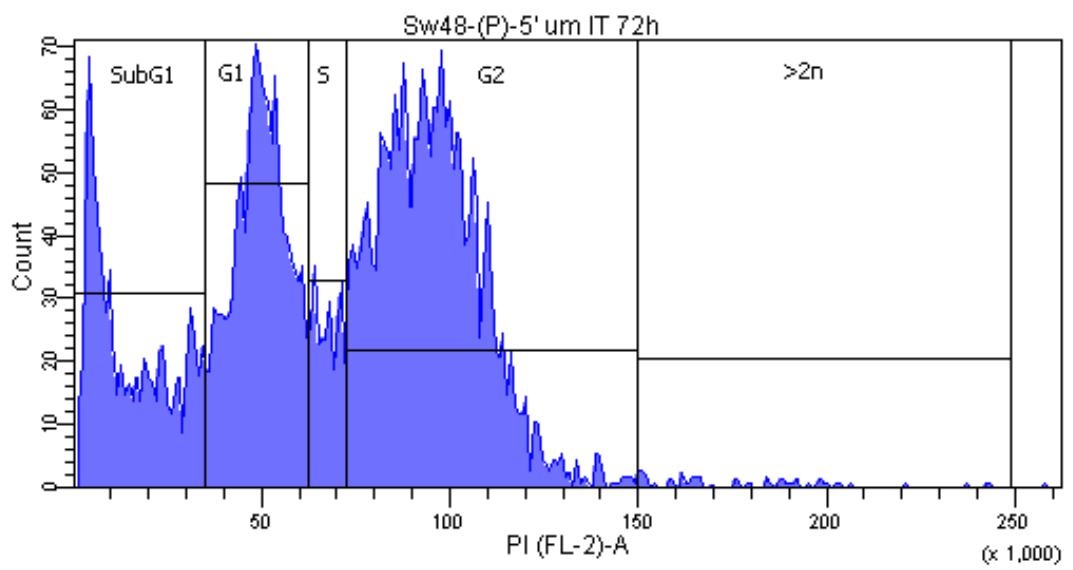
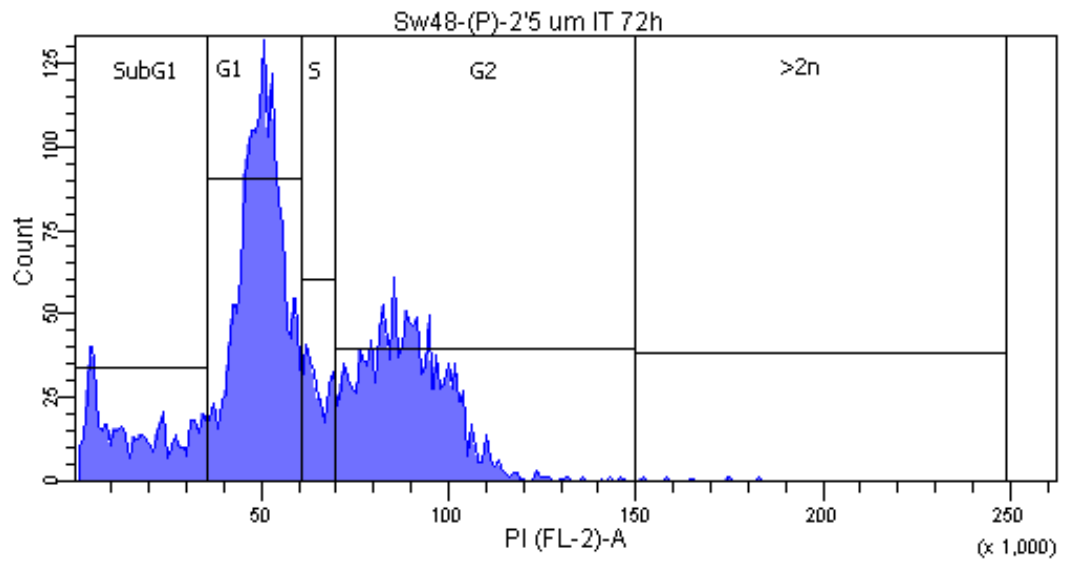
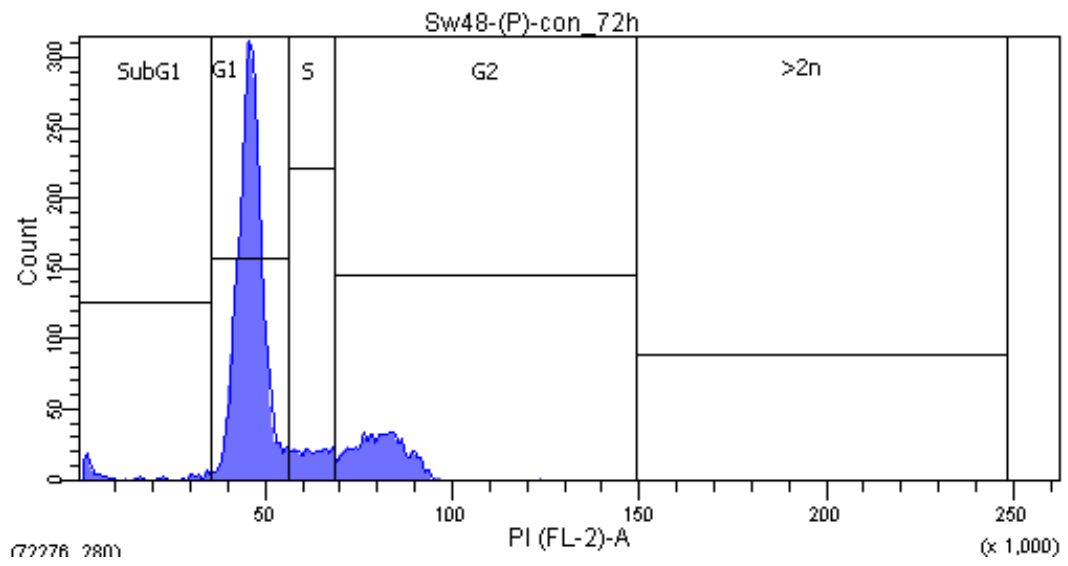
UICC 2010	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1/ T2	N0	M0
Stadium II	T3/ T4	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
Stadium III	jedes T	N1/ N2	M0
IIIA	T1/ T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3/ T4	N1	M0
	T2/ T3	N2a	M0
	T1/ T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3/ T4a	N2b	M0
	T4b	N1/ N2	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1
IVA	jedes T	jedes N	M1a
IVB	jedes T	jedes N	M1b

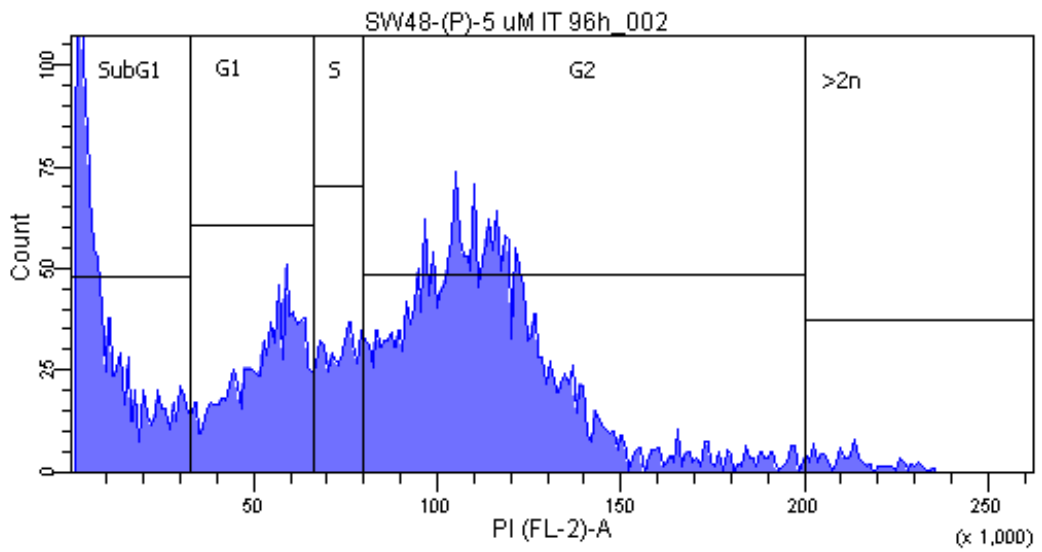
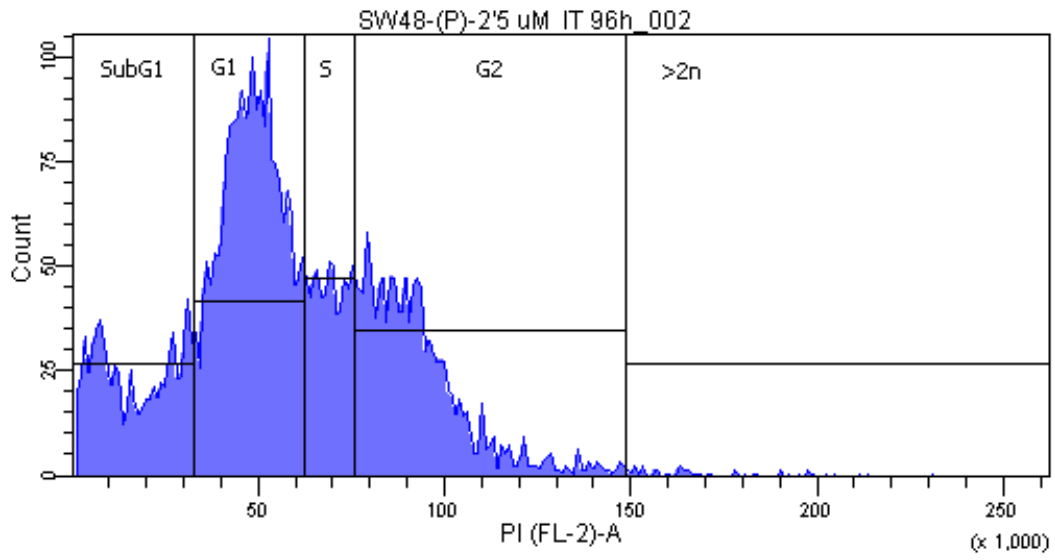
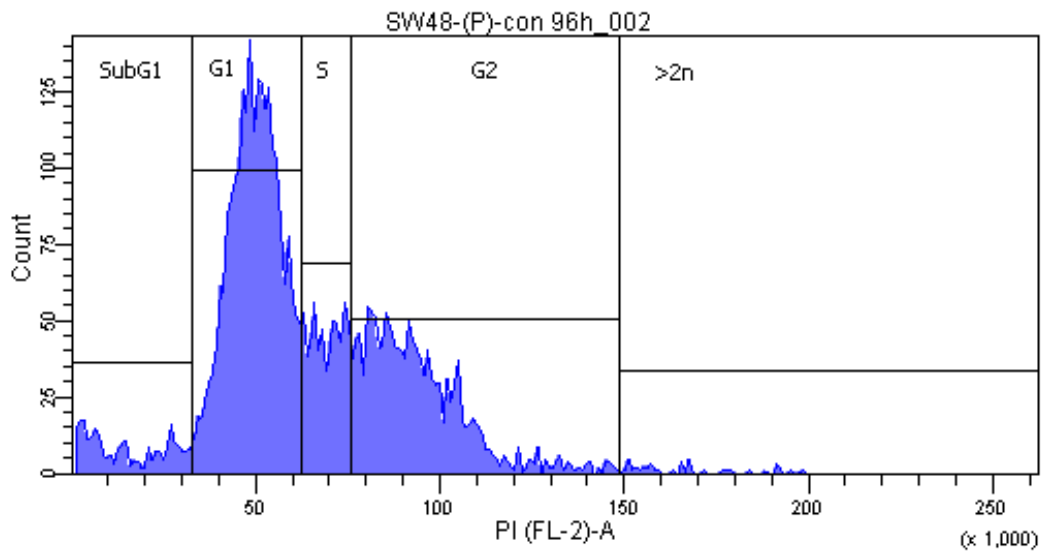
Anhang 3: Abbildung 37 Colony formation assay (CFA)



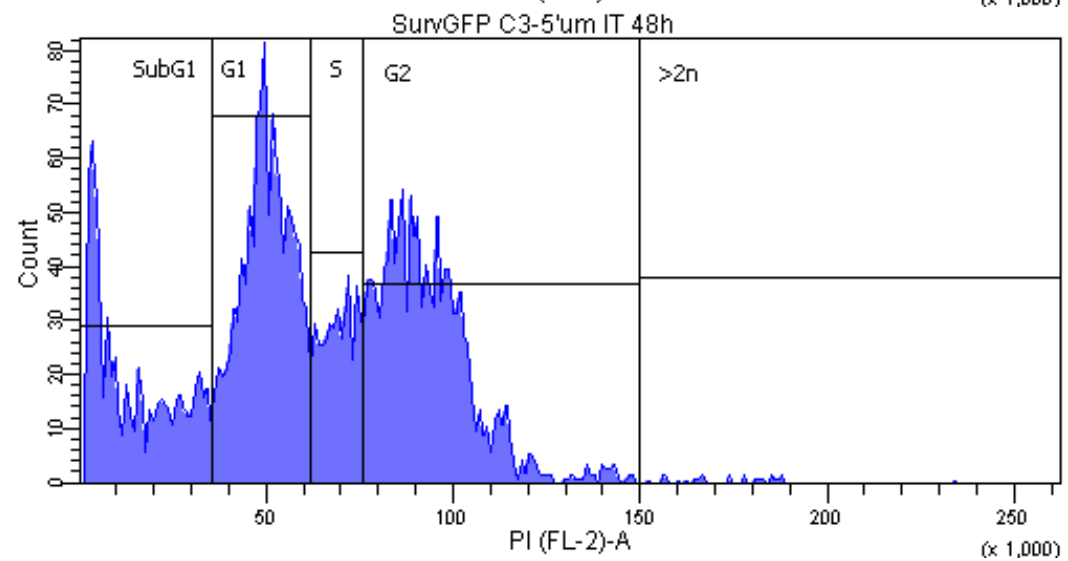
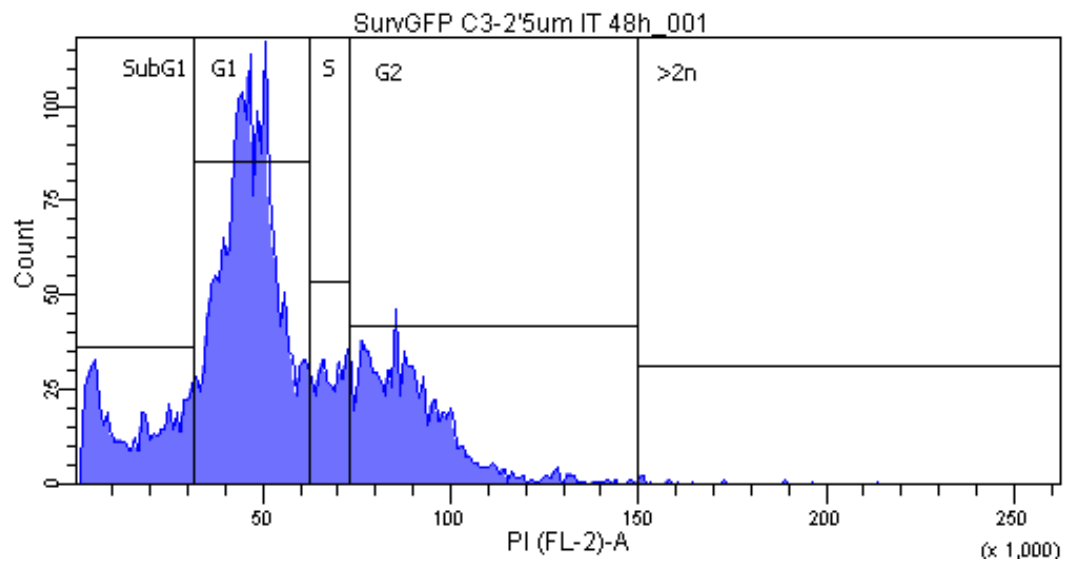
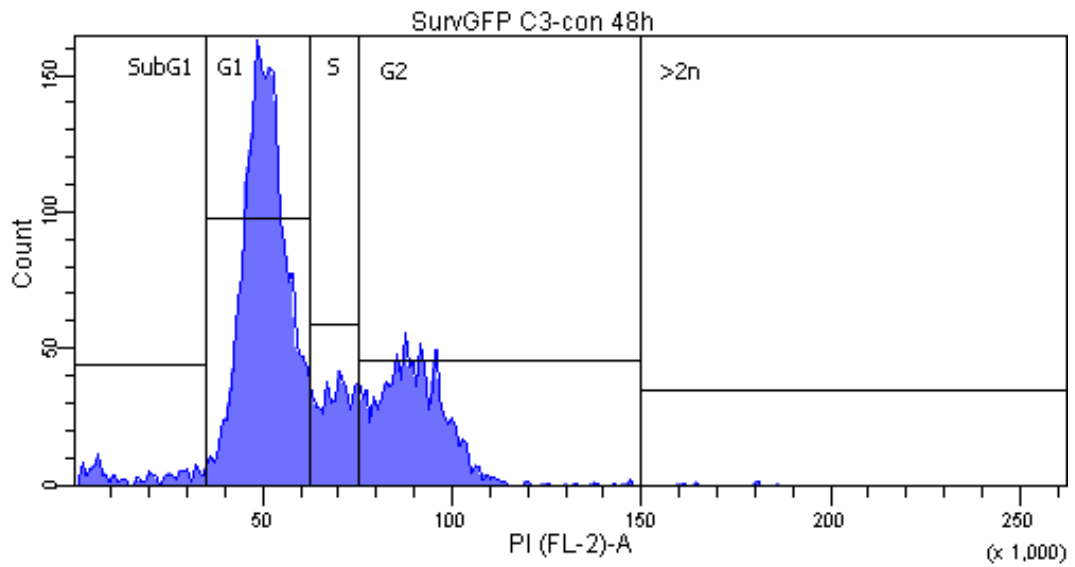
Anhang 4: Abbildung 38 **Durchflusszytometrische Histogramme SW48**
nach Exposition mittels 2.5 bzw. 5.0 μM IT

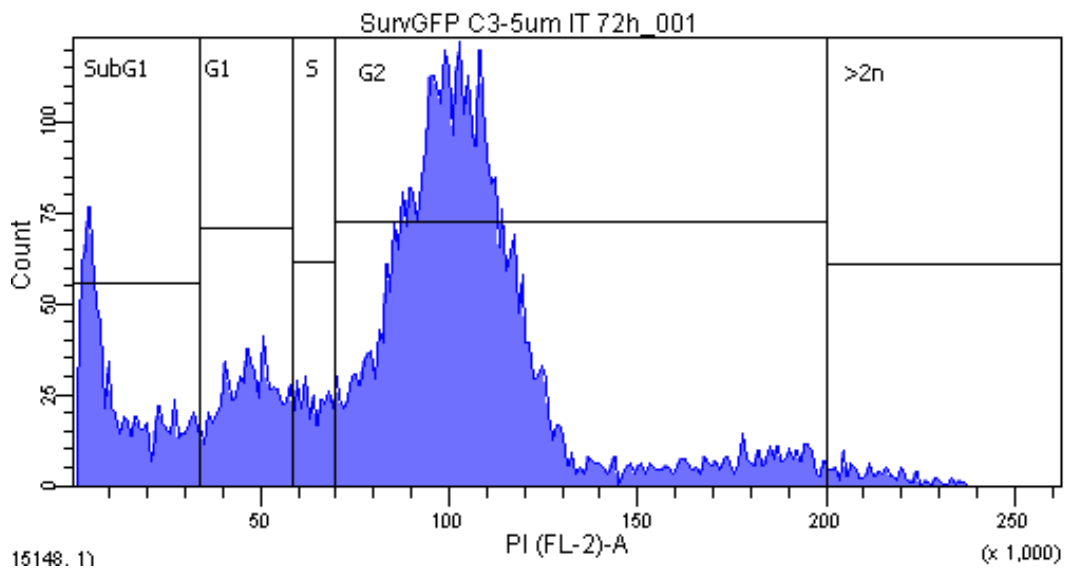
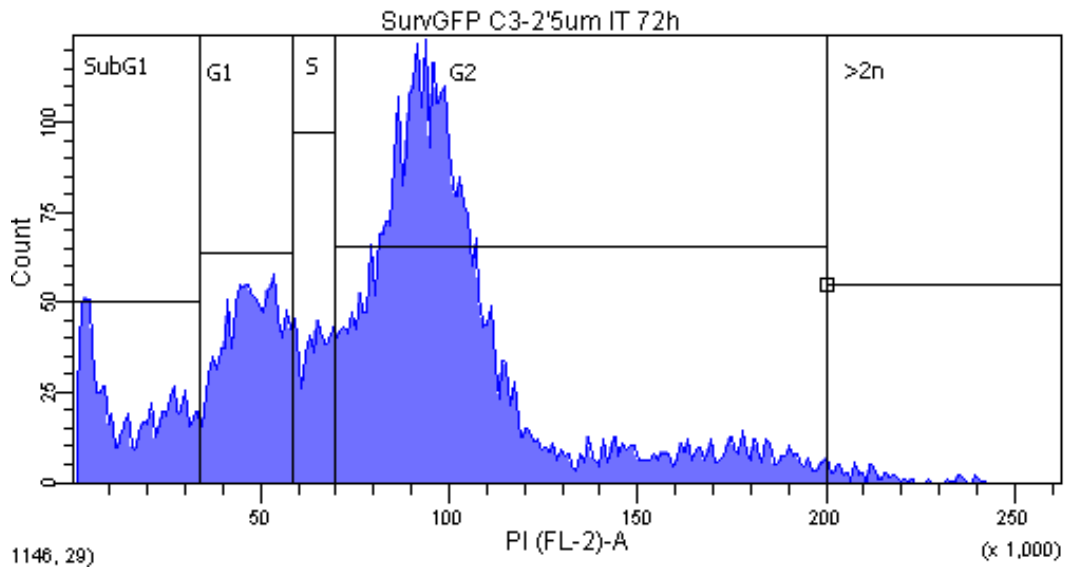
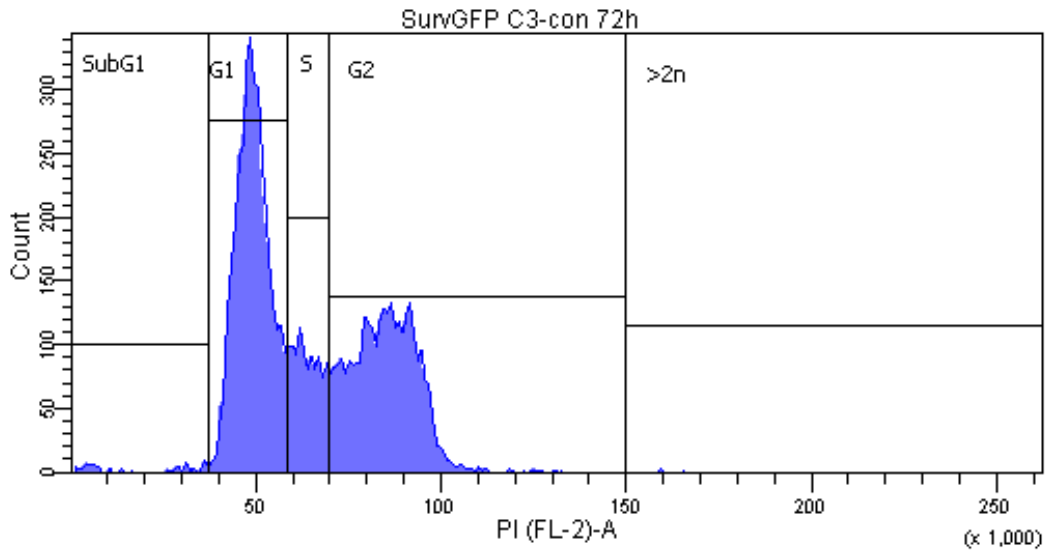


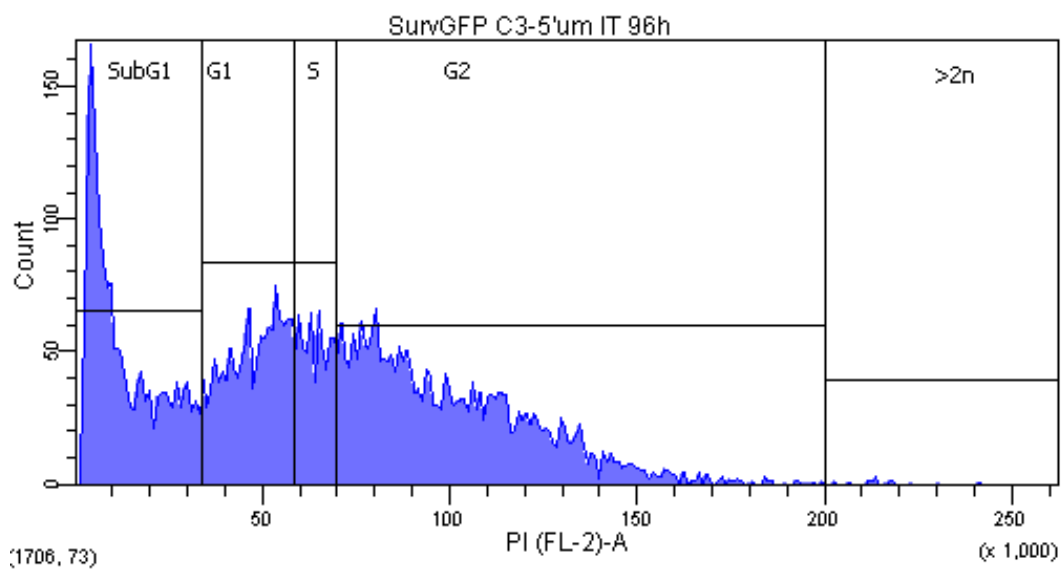
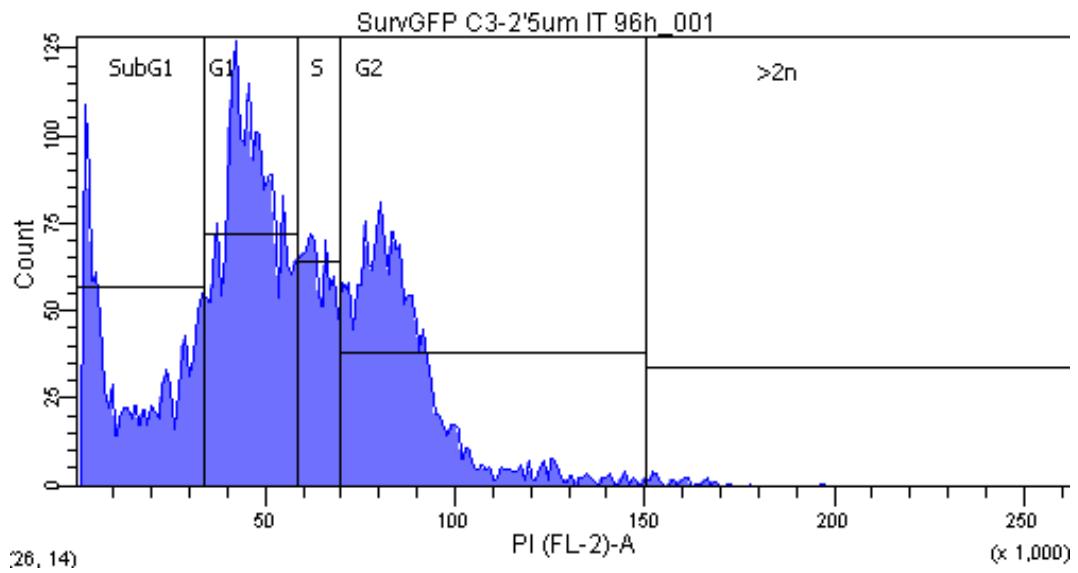
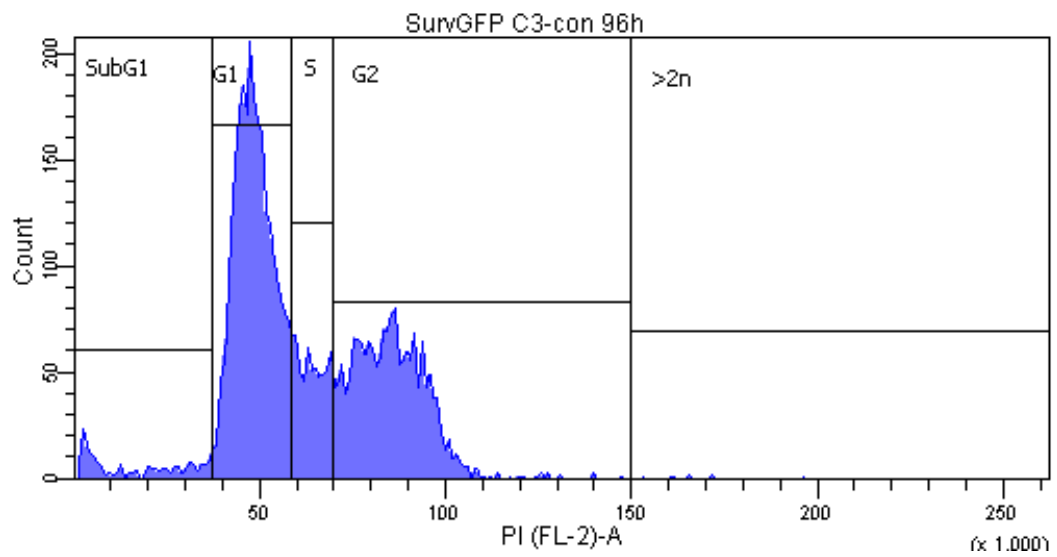


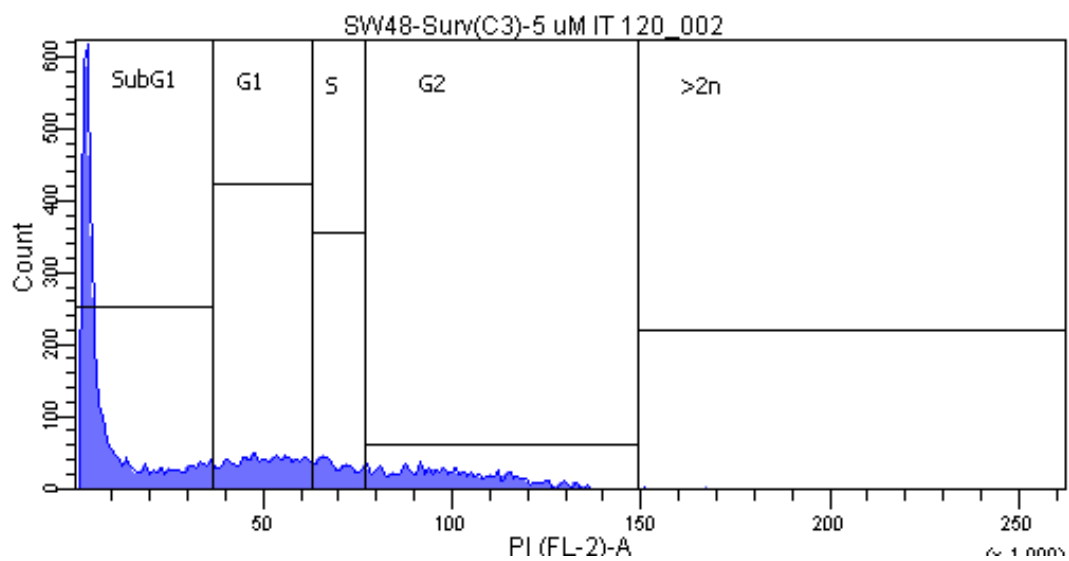
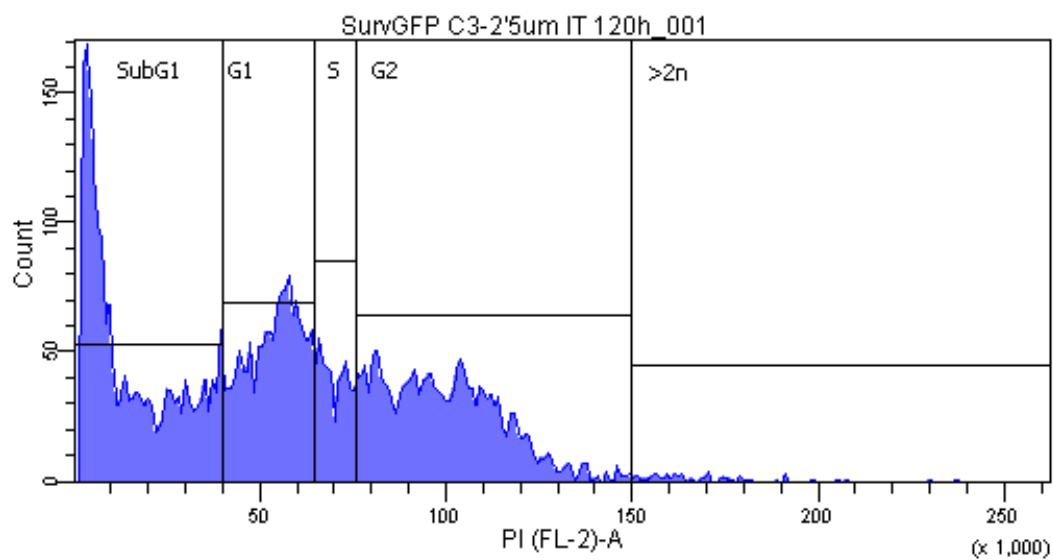
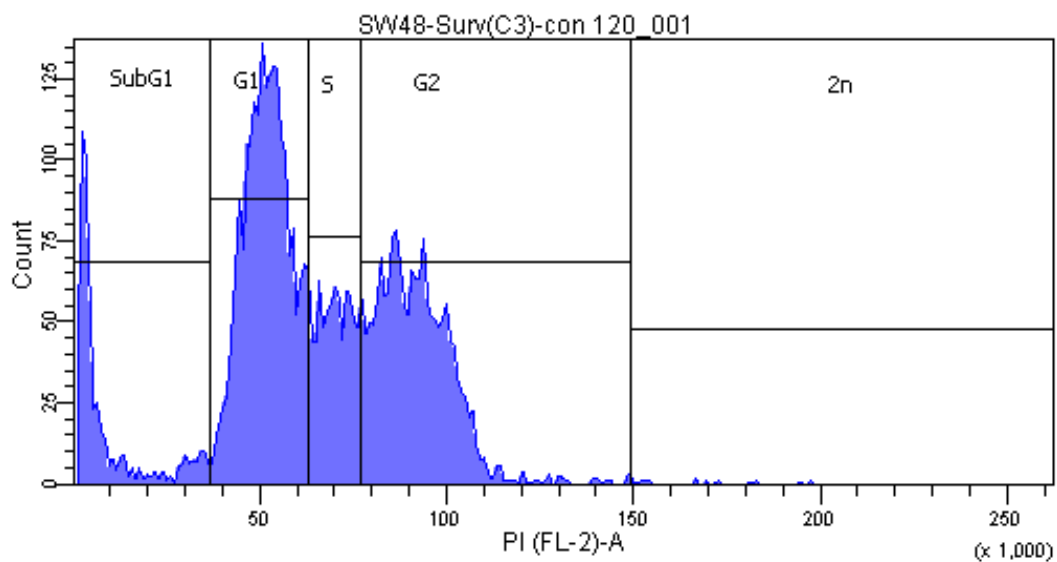


Anhang 5: Abbildung 39 **Durchflusszytometrische Histogramme Surv.GFP C3**
nach Exposition mittels 2.5 bzw. 5.0 μM IT



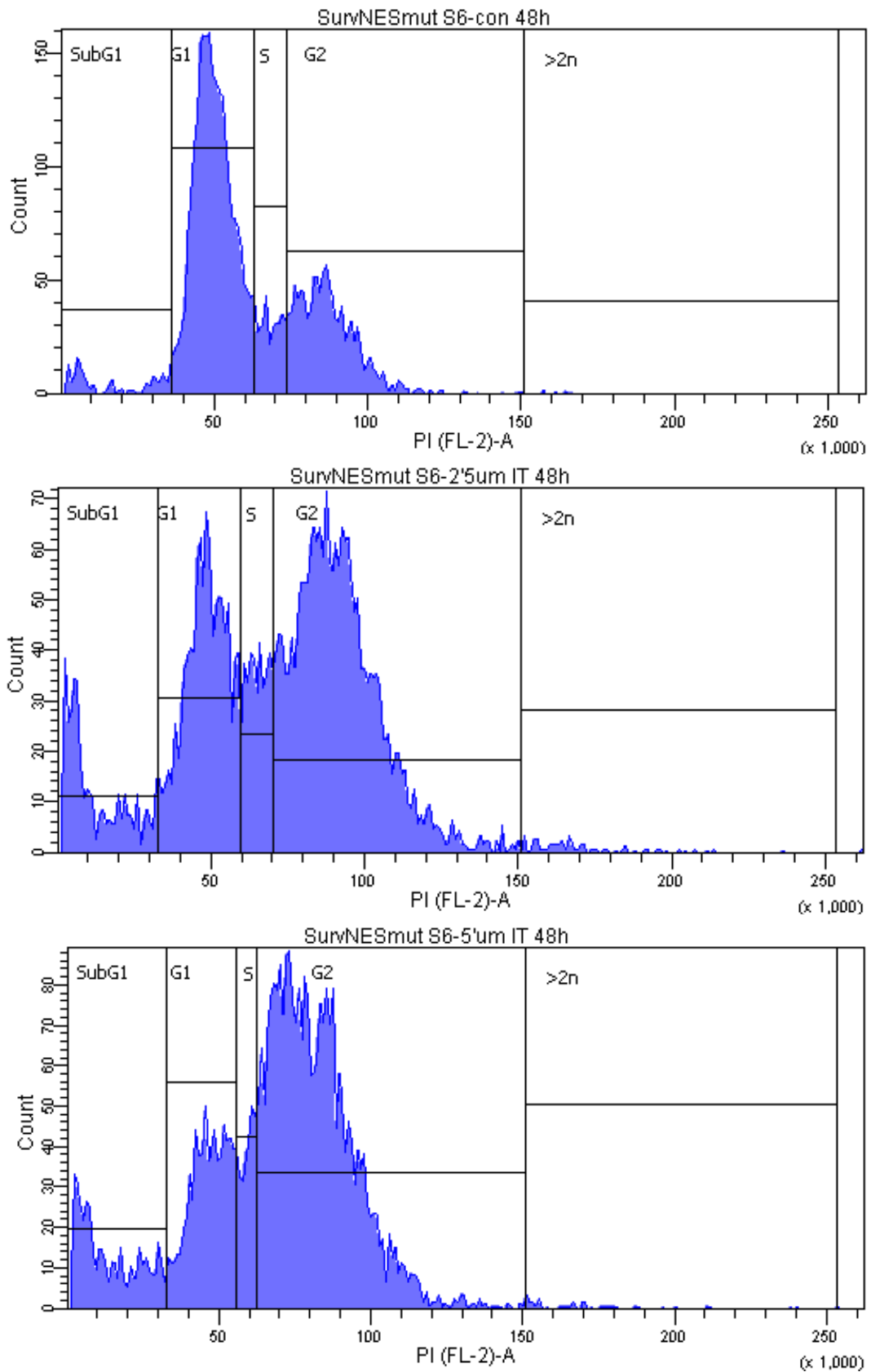


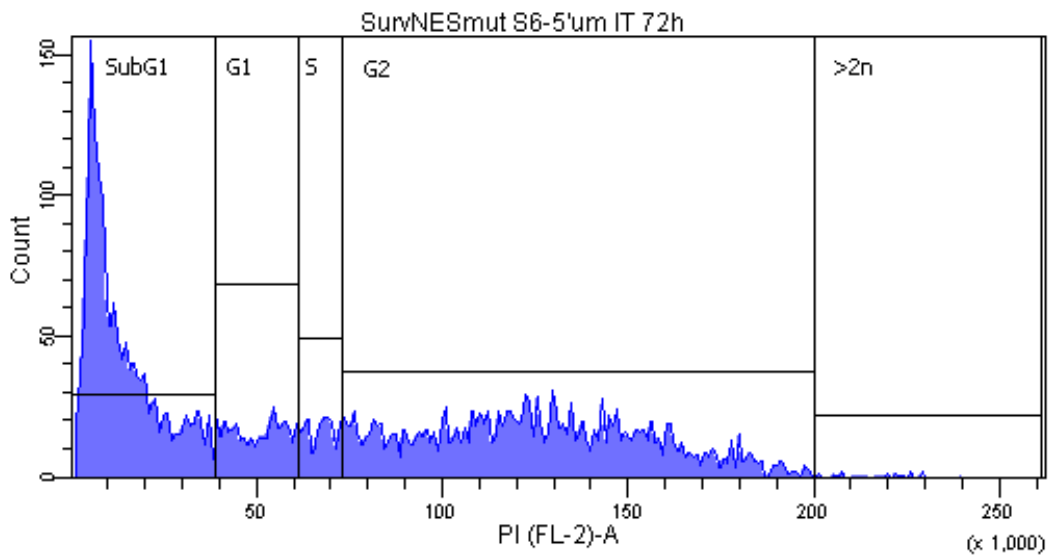
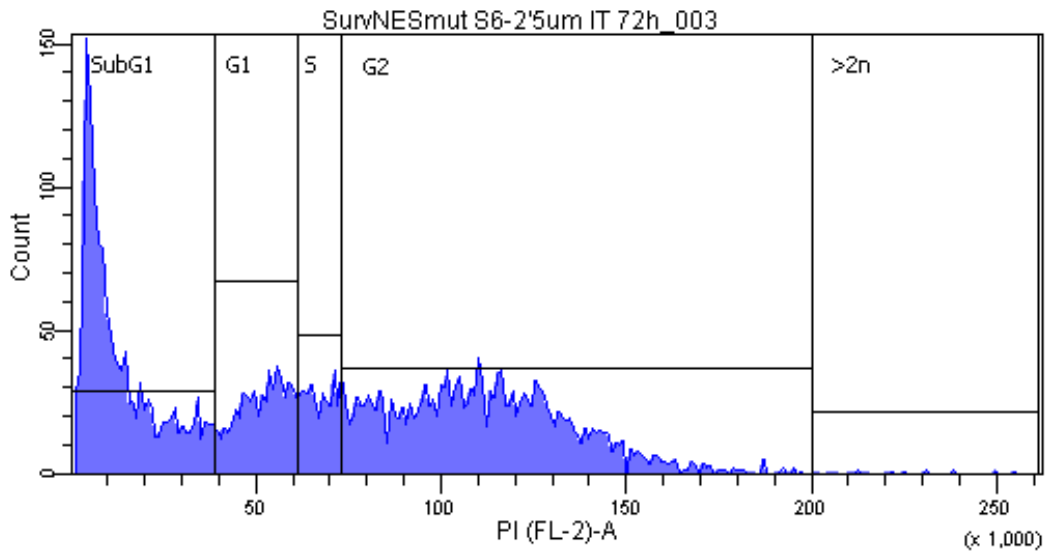
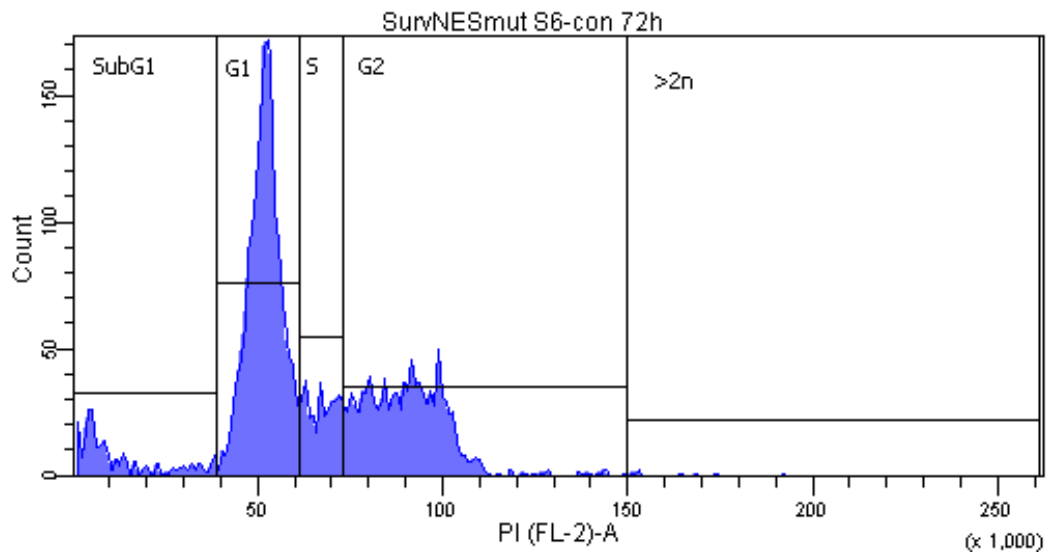


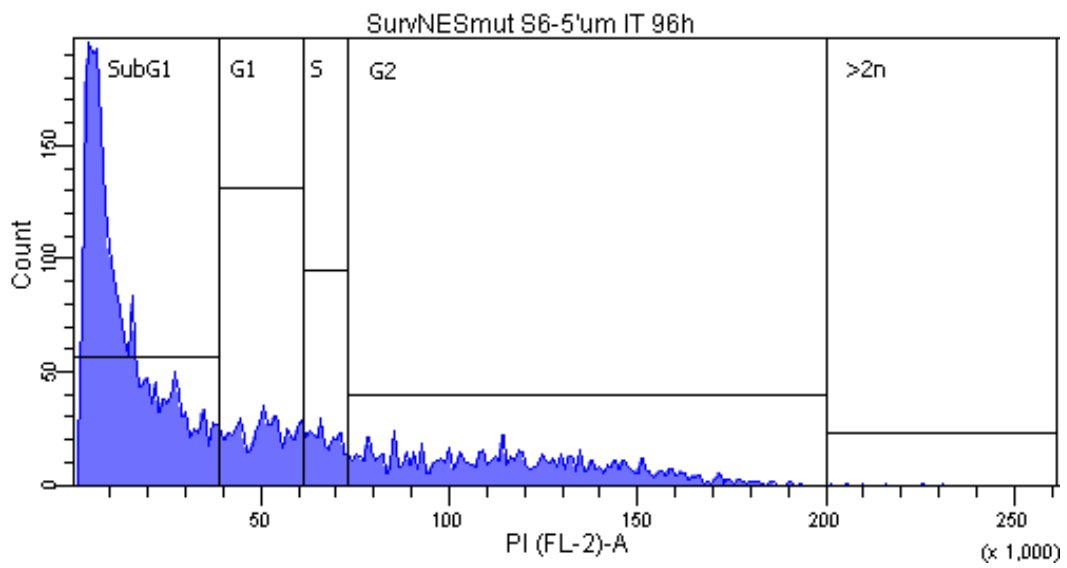
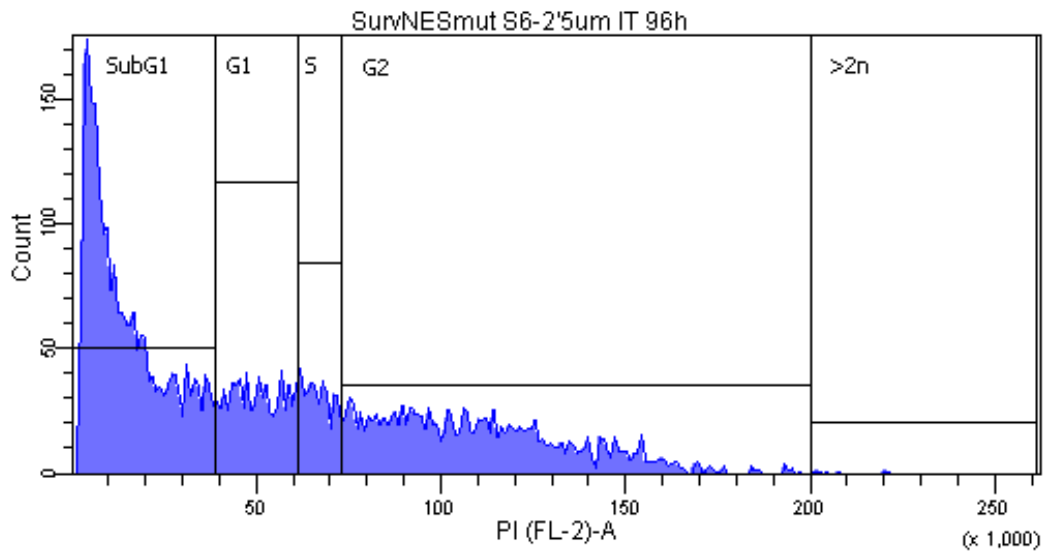
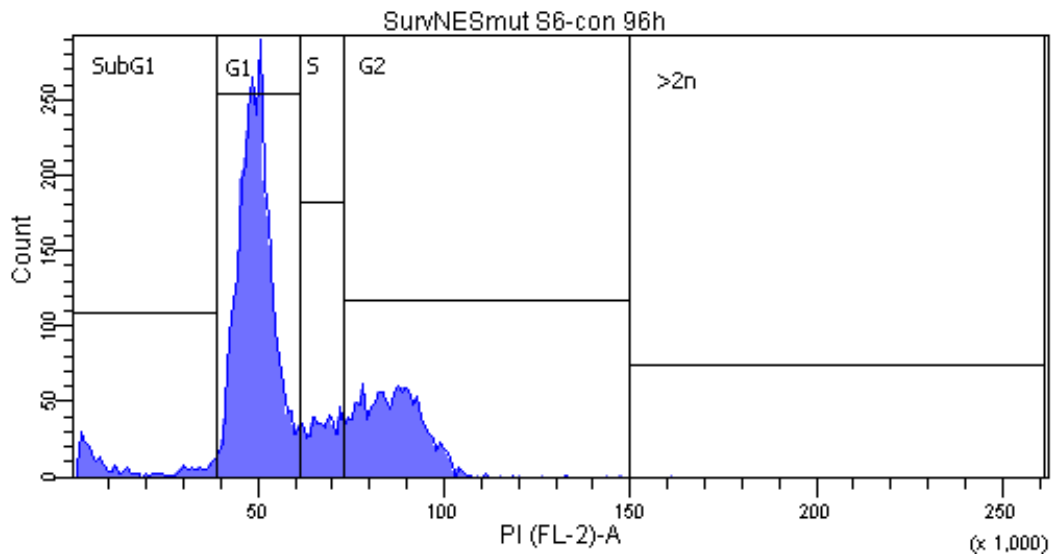


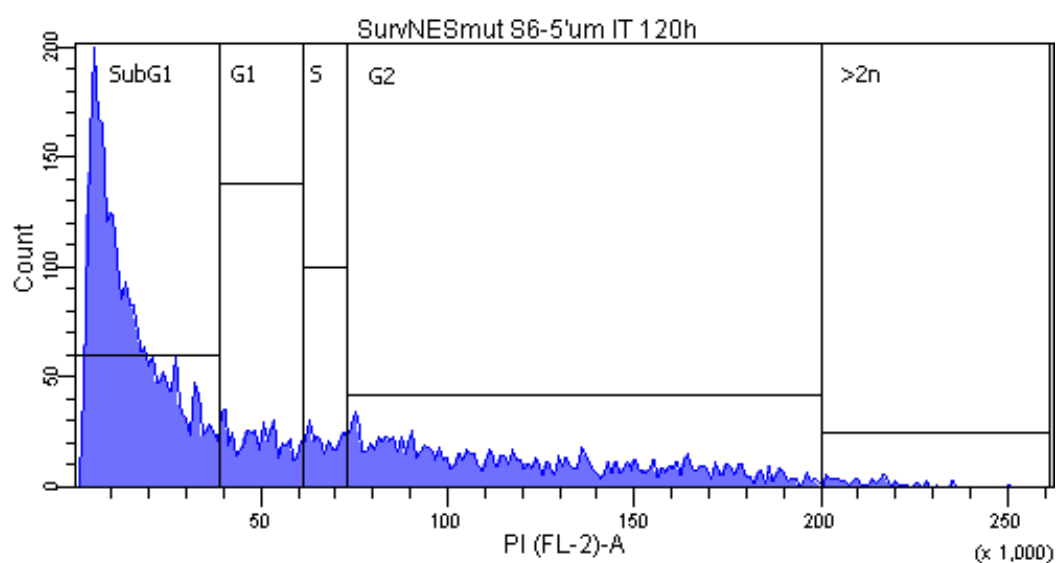
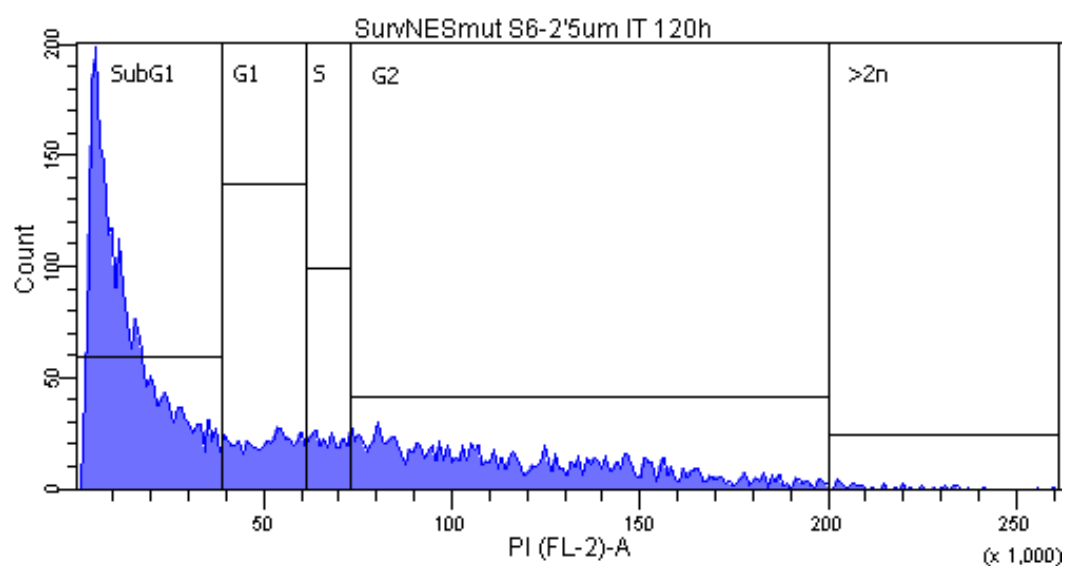
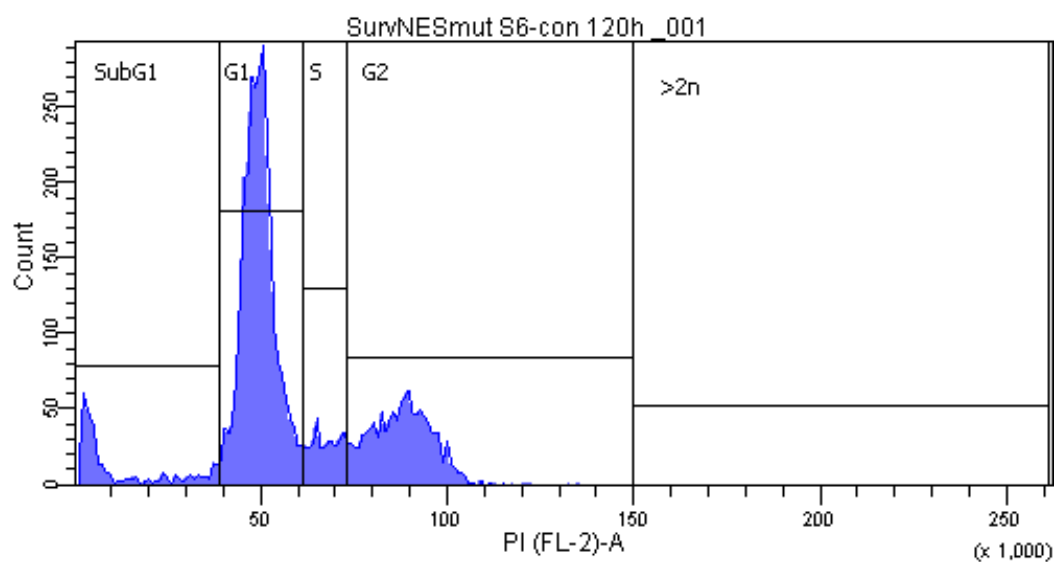
Anhang 6: Abbildung 40 **Durchflusszytometrische Histogramme Surv.NESmut S6**

nach Exposition mittels 2.5 bzw. 5.0 μM IT









Danksagung

Aufgrund von Datenschutz unkenntlich.

9 Lebenslauf

Aufgrund von Datenschutz unkenntlich.