



UNIVERSITÄTS**medizin.**
MAINZ



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Tumorrelevante Funktionen und therapeutische Bedeutung des PP2A/PR130-Komplexes im Pankreaskarzinom

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich 09 der
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Angefertigt am
Institut für Toxikologie der Universitätsmedizin

von
Thi Phuc Nhien Alexandra Nguyen
aus Darmstadt

Mainz, 2024

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2020 – Oktober 2023 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Oliver H. Krämer am Institut für Toxikologie der Universitätsmedizin in Mainz angefertigt.

Dekanin	Prof. Dr. Eva Rentschler
1. Gutachter	Prof. Dr. Oliver H. Krämer
2. Gutachter	Prof. Dr. Gerald Gimpl

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2024

Ich, **Thi Phuc Nhien Alexandra Nguyen**, Matrikelnummer **2713914** versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen schriftlichen und elektronischen Quellen sowie andere Hilfsmittel benutzt habe. Alle Ausführungen, die andere Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, habe ich kenntlich gemacht.

19.06.2024, *PhucNhien*

Datum, Unterschrift

An dieser Stelle möchte ich bei allen bedanken, die mich nicht nur in den letzten 3,5 Jahren, sondern auch für viele weitere Jahre begleitet und mir in jeder Situation beigestanden haben.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. O. H. Krämer für seine Betreuung während meiner Dissertation bedanken. Die Möglichkeit, meine Forschungsarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen, hat meinen wissenschaftlichen Fortschritt maßgeblich beeinflusst. Seine fachliche Expertise und die anregenden Diskussionen waren von großer Bedeutung für die Entwicklung meiner Arbeit.

Ich danke Prof. G. Gimpl herzlich für seine entscheidende Unterstützung während meiner akademischen Laufbahn im Fach Biochemie. Die Möglichkeit, in seinem Labor zu forschen und an einem 4-wöchigen Forschungsmodul teilzunehmen, bereicherte meine Erfahrungen und vertiefte mein Verständnis für aktuelle Forschungsthemen. Sowohl bei meiner Bachelorthesis als auch bei meiner Masterarbeit und nun bei dieser Dissertation hat Prof. G. Gimpl freundlicherweise die Funktion des Zweitgutachters übernommen.

Auch bei der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit für all die Jahre bedanken. An dieser Stelle möchte ich mich bei Alessa bedanken, die das (Un)Glück hatte, meine erste Studentin während meiner Promotionszeit zu sein. Danke für deine Geduld, insbesondere während unserer intensiven Stunden am FACS. Trotz der Herausforderungen warst du stets eine Unterstützung und deine Ergebnisse haben entscheidend zur Bearbeitung der Thematik beigetragen.

Mein besonderer Dank geht an Tina, Hassan und vor allem an meine Sailor Kriegerinnen Yanostat, Wichtel und Miripo. Danke, dass ihr mit mir gelacht, geweint, gezittert und gefeiert habt. Ich hatte das unfassbare Glück wahre Freunde in euch gefunden zu haben. Die gemeinsamen Momente am Institut werden mir noch viele Jahre in Erinnerung bleiben.

Zu guter Letzt möchte ich mich von Herzen bei meinen Eltern und meinen Geschwistern bedanken. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt und mich ermutigt habt meinen Weg zu gehen. Ihr seid und bleibt meine ewigen Begleiter, egal in welcher Situation. Ba, Ma, Me, Sabi, Lisa, Nina, Tomate und Sophie: Danke, dass ich immer auf euch zählen kann!

Inhaltsverzeichnis

I. Abbildungsverzeichnis	II
II. Tabellenverzeichnis	VI
III. Abkürzungsverzeichnis	VII
IV. Zusammenfassung.....	1
V. Abstract.....	3
1. Einleitung.....	5
1.1. Die Entstehung von Krebs	5
1.1.1. PDAC (<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i>)	6
1.1.2. Die Zellen des Immunsystems und die Bildung von Leukämiezellen	9
1.2. Posttranslationale Modifikationen von Proteinen	11
1.2.1. Proteinphosphatase 2A	12
1.2.2. Histondeacetylasen	14
1.3. DNA-Schadensantwort und DNA-Reparaturmechanismen	17
1.3.1. DNA Schäden und Aktivierung der DNA-Schadensantwort	17
1.3.2. DNA-Reparaturmechanismen	21
1.3.3. Hydroxyurea (HU)	22
1.3.4. COH29 als RNRi.....	23
1.3.5. Irinotecan (IT)	24
1.3.6. Phendion (<i>1,10 - Phenanthrolin - 5,6 - dion</i> , PD)	25
1.4. Zellzyklus: Regulation und Kontrollpunkte	26
1.4.1. Adavosertib (MK-1775).....	29
1.5. Zelltodmechanismen	31
1.5.1. Apoptose.....	31
1.5.2. Nekrose.....	34
1.5.3. Autophagie	35
1.5.4. Mitotische Katastrophe	37

1.6. Hitzeschockproteine und ubiquitinäres Abbausystem	38
1.7. Signalwege	41
1.7.1. MAPK Signalkaskade	41
1.7.2. PI3K/AKT Signalweg	43
2. Zielsetzung	45
3. Material	47
3.1. Chemikalien	47
3.2. Inhibitoren	49
3.3. Puffer und Lösungen	50
3.4. Antikörper	53
3.4.1. Primäre Antikörper	53
3.4.2. Sekundäre Antikörper	55
3.5. siRNA und sgRNA	56
3.6. Kits	56
3.7. Geräte	57
3.8. Verbrauchsmaterialien	58
3.9. Medien und Medienzusätze	59
3.10. Zelllinien	60
3.11. Softwares	63
4. Methoden	64
4.1. Zellkultur	64
4.1.1. Auftauen von Zellen	64
4.1.2. Erhaltungskultur	65
4.1.3. Kryokonservierung	66
4.1.4. Zellzahlbestimmung und Aussaat	66
4.1.5. Behandlung	68
4.1.6. Transiente Transfektion	69
4.1.7. Stabile Transfektion (CRISPR-Cas9) [410]	70

4.2. Durchflusszytometrische Analysen	72
4.2.1. Zellvitalitätsanalyse mittels Annexin/PI-Doppelfärbung.....	72
4.2.2. Zellzyklusanalyse und SubG1 Bestimmung.....	73
4.2.3. Färbung und Detektion von Aggresomen	74
4.2.4. Isolierung und Färbung der PBMC Populationen	75
4.3. Proteinexpressionsanalysen	76
4.3.1. Herstellung von Proteinlysaten	76
4.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford [424]	77
4.3.3. SDS-Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse	78
4.3.4. Proteindetektion	80
4.4. Immunfluoreszenz.....	81
4.4.1. Vorbereitung der Deckgläser.....	81
4.4.2. Aussaat und Fixierung der Zellen	81
4.4.3. Permeabilisierung, Blocken unspezifischer Bindungsstellen und Färbung der Zellen	82
4.4.4. Nukleusfärbung und Versiegelung	82
4.5. SILAC und Proteomanalyse [432, 433]	83
4.6. Statistik	84
5. Ergebnisse.....	85
5.1. Induktion der DNA-Schadensantwort durch HU und Analyse der biologischen Effekte von MS-275 im murinen PDAC Zellsystem.....	85
5.1.1. Analysen des Zellzyklus muriner PDAC Zellen nach Behandlung mit HU und MS-275.....	85
5.1.2. Zelltodbestimmung nach einer HU und MS-275 Behandlung in murinen PDAC Zellen.....	88
5.1.3. Induktion der DNA-Schadensantwort durch die Behandlung der PDAC Zellen mit HU und MS-275	89
5.1.4. Entinostat schwächt die Effekte von HU in murinen PDAC Zellen ab	90

5.1.5. ATM ist pro-apoptotisch in mit HU-behandelten PDAC Zellen.....	91
5.2. Charakterisierung der Effekte eines Topoisomerase-1-Inhibitors in murinen PDAC Zelllinien	94
5.2.1. Zellzyklusanalyse von IT-behandelten murinen PDAC Zellen	94
5.2.2. Die Inhibitoren IT und HU im direkten Vergleich	95
5.3. Analyse der biochemischen und zellulären Wirkung eines weiteren RNRi in murinen PDAC Zellen	96
5.3.1. COH29 Behandlung führt zur DNA-Fragmentierung in murinen PDAC Zellen	96
5.4. Charakterisierung der murinen PDAC Zelllinien hinsichtlich ihrer biologischen Effekte auf die Anwendung des PP2A-Inhibitors PD.....	98
5.4.1. Gliederung der murinen PDAC Zellen in verschiedene Subtypen.....	98
5.4.2. Der mesenchymale Subtyp reagiert hoch sensitiv auf PD	100
5.4.3. Der epitheliale Subtyp ist robust gegenüber einer PD Behandlung	102
5.4.4. Zellzyklusanalyse der mit PD behandelten Zelllinien nach 24 h und 48 h	104
5.4.5. Kurzzeiteffekte von PD im mesenchymalen und epithelialen Subtyp	106
5.4.6. Die PD-bedingte Induktion der Apoptose in PDAC ist p53 unabhängig..	107
5.5. Charakterisierung der biochemischen Effekte von PD in humanen PDAC Zelllinien	108
5.5.1. Zelltodbestimmung der PD-behandelten PDAC Zelllinien nach 24 h und 48 h	108
5.5.2. Apoptose als zentraler Zelltodmechanismus in humanen PDAC Zellen .	111
5.5.3. Zellzyklusanalyse und Induktion von γ -H2AX in PD-behandelten MIA PaCA-2 Zellen.....	112
5.5.4. Zellzyklusanalyse der mit PD behandelten PDAC Zelllinien	114
5.5.5. PD Behandlung führt in allen getesteten humanen PDAC Zelllinien zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort	116
5.6. Charakterisierung der biochemischen und zellulären Effekte von PD in Leukämiezellen	118

5.6.1. Zelltodbestimmung in AML, ALL, CML und Burkitt-Lymphomzelllinien bei PD Behandlung nach 24 h	118
5.6.2. Langzeiteffekte von PD in leukämische Zellen.....	119
5.7. Charakterisierung von PD in normal proliferierenden Zellen	120
5.7.1. Dosisabhängige PD-Effekte in RPE-1 Zellen nach 24 h	120
5.7.2. Dosisabhängige PD-Effekte in PBMCs nach 24 h.....	122
5.8. Die Effekte von PD basieren auf einer spezifischen Reduktion der funktionalen Untereinheit PP2A/PR130	123
5.8.1. Epitheliale murine PDAC Zelllinien zeigen keine Reduktion von PR130 durch PD	123
5.8.2. Chloroquin kann den PD-bedingten Abbau von PR130 nicht entgegenwirken.....	125
5.8.3. Der PD-bedingte Abbau von PR130 erfolgt über das Proteasom.....	126
5.8.4. Die PD-Behandlung führt zu einer Induktion von HSP70 im mesenchymalen Subtyp.....	127
5.8.5. MIA PaCA-2 Zellen induzieren HSP70 bei Behandlung mit PD.....	130
5.8.6. Die Kombination von PD und einem HSP70-Inhibitor zeigen synergistische Effekte in den getesteten PDAC Zelllinien	131
5.8.7. Die Behandlung mit PD führt in PDAC Zellen zur Entstehung von zytotoxischen Proteinaggregaten.....	132
5.8.8. Die Ausschaltung von PR130 steigert die Apoptose und begünstigt die Bildung der zytotoxischen Proteinaggregate in PDAC Zellen	134
5.9. Die Kombination aus PD und einem WEE1-Inhibitor erwies sich als ein guter therapeutischer Angriffspunkt in PDAC und Leukämiezellen	136
5.9.1. Zellzyklusanalyse und Zelltodbestimmung in mit PD und MK-1775 behandelten MIA PaCA-2 Zellen	136
5.9.2. Die Inhibitoren PD und MK-1775 lösen in MIA PaCA-2 Zellen eine mitotische Katastrophe aus.....	139
5.9.3. Die zytotoxischen Effekte von PD und MK-1775 sind auf murine PDAC Zelllinien übertragbar	141

5.9.4. Die Kombination von PD und MK-1775 ist für leukämische Zellen toxisch	143
5.9.5. Die Kombination von PD und MK-1775 lösen keine zytotoxischen Effekte in PBMCs aus.....	146
6. Diskussion	147
6.1. Molekulare Effekte von HU, MS-275, IT und COH29 im murinen PDAC Zellsystem.....	147
6.1.1. Hemmung von Klasse I HDACs führt in murinen PDAC Zellen nicht zum Zelltod	147
6.1.2. Die inhibitorische Wirkung auf die RNR von COH29 ist stärker als von HU	148
6.1.3. Die Behandlung mit HU, MS-275 und COH29 führen in PDAC Zellen zu einem Verlust von CHK1	149
6.1.4. ATM ist essenziell für eine erfolgreiche Induktion der Apoptose im murinen PDAC Zellsystem	150
6.1.5. Die Behandlung mit HU führt zu einer Akkumulation von RRM2 in PDAC Zellen	151
6.1.6. RAD51 wird durch MS-275 reguliert	152
6.1.7. Die Rolle von IT in PDAC.....	152
6.2. Die Hemmung von PP2A hat unterschiedliche Auswirkungen in murine und humane PDAC Zelllinien, sowie in Leukämie und in normal proliferierenden Zellen	154
6.2.1. Die Phänotypen der murinen PDAC Zelllinien und ihre unterschiedlichen Reaktionen auf PD	154
6.2.2. Murine PDAC Subtypen und humane PDAC Zelllinien im Vergleich.....	156
6.2.3. PP2A-abhängige Effekte in MIA PaCA-2 und RPE-1 Zellen	157
6.2.4. Die PD-bedingte Apoptose in PDAC Zellen kann durch Z-VAD-FMK und Navitoclax moduliert werden	157
6.2.5. Die Rolle von PP2A in Leukämiezellen	158

6.3. Das Zusammenspiel von PR130, HSP70 und der Bildung von Proteinaggregate in PDAC Zellen	159
6.3.1. PR130 wird bei einer Behandlung mit PD über das Proteasom abgebaut	159
6.3.2. Die spezifische Induktion von HSP70 schützt PD-behandelte PDAC Zelllinien nicht vor dem Zelltod	160
6.3.3. Die Bildung der Proteinaggregate ist verantwortlich für die hohe Apoptoserate im PDAC Zellsystem	162
6.3.4. Die toxischen Effekte einer PP2A-Inhibierung in PDAC Zellen können mit einem HSP70i verstärkt werden	164
6.3.5. Ein genetischer <i>knockdown</i> von PR130 verstärkt die zytotoxischen Effekte von PD im PDAC Zellsystem	165
6.4. Die Inhibierung von PP2A und der WEE1-Kinase resultiert in einer mitotischen Katastrophe.....	166
7. Anhang.....	171
8. Literaturverzeichnis	176
A. Publikationen	XI
B. Lehre & Betreuung.....	XII
C. Konferenzen.....	XIII
D. Lebenslauf	XIII

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hämatopoese von gesunden Blutzellen (links) und von Leukämiezellen (rechts).....	10
Abbildung 2: Relevante Funktionen und Untereinheiten der Proteinphosphatase 2A.	13
Abbildung 3: Die Rolle der Histondeacetylase und der Histonacetyltransferase in Zellen.	16
Abbildung 4: Aktivierung der DNA Schadensantwort in einer Zelle.	18
Abbildung 5: Die DNA Reparaturmechanismen sind zellzyklusabhängig.	21
Abbildung 6: Die Aktivität der Ribonukleotidreduktase wird durch Hydroxyurea inhibiert.	23
Abbildung 7: Strukturformel von IT und seiner aktiven Form SN-38.	24
Abbildung 8: Chemische Strukturformel des PP2 Inhibitors PD.....	25
Abbildung 9: Der G2/M Kontrollpunkt im Zellzyklus.....	27
Abbildung 10: Die Aufgaben der Ser/Thr-Kinase PLK1 am G2/M Kontrollpunkt.	28
Abbildung 11: Die Apoptose kann extrinsisch oder intrinsisch induziert werden.	33
Abbildung 12: Apoptose, Nekrose und Autophagie im Überblick.	36
Abbildung 13: Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems.....	40
Abbildung 14: Die MAPK-Signalkaskade.....	41
Abbildung 15: Der PI3K/AKT Signalweg.	44
Abbildung 16: Schematische Darstellung für eine stabile Transfektion nach dem CRISPR-Cas9 Verfahren.....	71
Abbildung 17: Aufbau einer Blotkassette.....	80
Abbildung 18: Zellzyklusverteilungen von mit HU und MS-275 behandelten murinen PDAC Zellen nach 24 h [440].....	86
Abbildung 19: Die Behandlung mit HU und MS-275 führt zur Induktion der SubG1-Fraktion nach 48 h [440].....	87
Abbildung 20: Induktion der Apoptose durch HU und MS-275 [440].	88
Abbildung 21: Nachweis der Proteinexpression und posttranslationaler Modifikationen als Reaktion auf eine Behandlung mit HU und MS-275 im PDAC Zellsystem [440].	89
Abbildung 22: Die Effekte von HU werden in der Kombinationstherapie mit MS-275 vermindert [440].....	91

Abbildung 23: FACS-Analysen zeigen die Auswirkungen von HU und KU-60019 auf die Zellzyklusverteilung und die Apoptose-assoziierte DNA-Fragmentierung [440].	92
Abbildung 24: Immunoblots zeigen die Auswirkungen von HU und KU-60019 auf die DNA-Schadensantwort [440].	93
Abbildung 25: Irinotecan zeigt keine Wirkung in allen getesteten murinen PDAC Zelllinien [440].	94
Abbildung 26: HU induziert Apoptose effektiver als IT im PDAC Zellsystem [440].	96
Abbildung 27: COH29 Behandlung führt zur Zelltodinduktion im PDAC Zellsystem [440].	97
Abbildung 28: Ppp2r3a werden im mesenchymalen PDAC Subtyp stärker exprimiert.	98
Abbildung 29: PR130 ist auf Proteinebene im mesenchymalen PDAC Subtyp stark ausgeprägt.	99
Abbildung 30: Der mesenchymale Subtyp des PDAC ist empfindlich gegenüber dem PP2A-Inhibitor PD.	100
Abbildung 31: Annexin-V Färbung und Zelltodbestimmung der murinen mesenchymalen PDAC Zelllinien.	101
Abbildung 32: Annexin-V/PI-Färbung und Zelltodbestimmung der murinen epithelialen PDAC Zelllinien nach PD-Behandlungen.	102
Abbildung 33: Ein Zeitverlauf der PD – Behandlung zeigt nach kurzen Zeitwerten die zunehmende Apoptoserate des mesenchymalen Subtyps.	103
Abbildung 34: FACS Analysen zeigen die Auswirkungen auf den Zellzyklus von PD in murinen PDAC Zelllinien.	104
Abbildung 35: Zellzyklusanalyse der murinen PDAC Zelllinien bei einer PD-Behandlung nach 48 h.	105
Abbildung 36: Die PD-Behandlung führt nach kurzen Zeitwerten zu einer Aktivierung der DNA-Schadensantwort, sowie der PI3K/AKT und MAPK/ERK Signalwege im epithelialen und mesenchymalen Subtyp.	106
Abbildung 37: Die Induktion von Apoptose in PD-behandelten Zellen ist p53-unabhängig.	107
Abbildung 38: Der PP2A-Inhibitor PD induziert in humanen PDAC Zelllinien Apoptose.	109
Abbildung 39: PD zeigt auch bei humanen PDAC Zelllinien zytotoxische Effekte.	110

Abbildung 40: Apoptose ist der hauptsächliche Zelltodmechanismus, der bei einer PD-Behandlung in MIA PaCA-2 Zellen induziert wird.	111
Abbildung 41: PD-Behandlung führt zu einer DNA-Fragmentierung in MIA PaCA-2 Zellen.	113
Abbildung 42: PD-Behandlung führt nach 48 h zu einer DNA-Fragmentierung in allen getesteten humanen PDAC Zelllinien.	115
Abbildung 43: PD führt auch in humanen PDAC Zellen zu einer Aktivierung der DNA-Schadensantwort, der PI3K/AKT und der MAPK/ERK Signalwege.	117
Abbildung 44: PD führt in allen getesteten Leukämiezellen zur Induktion der Apoptose.	119
Abbildung 45: PD ist nach 72 h trotz niedriger Dosierung ebenfalls zytotoxisch für leukämische Zellen.	120
Abbildung 46: Die Behandlung von PD führt bei normalen Körperzellen zu einer Aktivierung der DNA-Schadensantwort, jedoch nicht zur Apoptose.	121
Abbildung 47: Effekte von PD in PBMC-Populationen.	122
Abbildung 48: Die PD-Behandlung führt in mesenchymalen PDAC Zelllinien zu einer Abnahme des PR130-Spiegels.	123
Abbildung 49: Die Behandlung der humanen PDAC Zelllinien mit PD führt zu einer Reduktion bis hin zum Verlust von PR130.	124
Abbildung 50: Die Hemmung der Autophagie steigert die zytotoxischen Effekte von PD in PDAC Zellen.	125
Abbildung 51: Der PD-bedingte Abbau von PR130 wird durch die Behandlung mit Lactacystin gehemmt.	126
Abbildung 52: Die PD-Behandlung von PDAC Zellen führt zu einer Induktion des Hitzeschockproteins HSP70.	128
Abbildung 53: Die PD-Behandlung der murinen PDAC Zellen führt zu einer HSP70 Induktion im mesenchymalen Subtyp.	129
Abbildung 54: In MIA PaCA-2 Zellen führt eine PD-Behandlung ebenfalls zur HSP70 Induktion.	130
Abbildung 55: Die Inhibierung von HSP70 verstärkt die apoptotische Wirkung von PD.	131
Abbildung 56: Mikroskopische Detektion von Ubiquitin, Vimentin sowie der cytotoxischen Proteinaggregate in MIA PaCA-2 Zellen.	133

Abbildung 57: Ein Knockdown von PR130 erhöht den zytotoxischen Effekt von PD in der humanen PDAC Zelllinie MIA PaCA-2.....	134
Abbildung 58: Ein Knockdown von PR130 erhöht die Bildung von zytotoxischen Proteinaggregaten nach einer Behandlung mit PD.	136
Abbildung 59: Die Kombination PD + MK-1775 führt zur Apoptose assoziierten DNA-Fragmentierung in MIA PaCA-2 Zellen.....	137
Abbildung 60: Die Kombination aus PD und MK-1775 führt zur mitotischen Katastrophe in MIA PaCA-2 Zellen.	140
Abbildung 61: Zytotoxische Effekte einer PD + MK-1775 Kombinationsbehandlung treten bei der epithelialen murinen PDAC Zelllinie nach 72 h ein.	142
Abbildung 62: Datenbankanalysen zeigen einen Zusammenhang zwischen der WEE1-Expression und dem Fortschreiten der Erkrankung bei AML.	143
Abbildung 63: Die Kombination aus PD und MK-1775 führt nach 24 h zur Apoptose-assoziierte DNA-Fragmentierung in leukämische Zellen.....	144
Abbildung 64: Sowohl der PP2A-Inhibitor als auch der WEE1-Kinase-Inhibitor zeigten keine zytotoxischen Effekte in den Immunzellen nach 24 h.	146

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einordnung der HDAC Klassen und Auflistung ihrer Mitglieder.	15
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien.	47
Tabelle 3: Verwendete Inhibitoren.	49
Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen.	50
Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper.	53
Tabelle 6: Alle verwendeten Sekundärantikörper.	55
Tabelle 7: Verwendete siRNAs und sgRNAs.	56
Tabelle 8: Verwendete Geräte.	57
Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	58
Tabelle 10: Medien und Medienzusätze.	59
Tabelle 11: Verwendete Zelllinien.	60
Tabelle 12: Genutzte Softwares.	63
Tabelle 13: Verwendete Schalengröße, Volumina und die dazugehörige ausgesäte Zellzahl.	67
Tabelle 14: Verwendete Inhibitoren, ihre Stammkonzentration und Lösungsmitteln.	68
Tabelle 15: Auflistung der Mastermixe für eine Transfektion mit siRNA.	69
Tabelle 16: Mastermixe für CRISPR-Cas9 Transfektionen.	70
Tabelle 17: BSA-Standardgerade für eine Proteinbestimmung nach Bradford.	78
Tabelle 18: Zusammensetzung der verwendeten Sammel- und Trenngele. Die angegebenen Mengen gelten jeweils für zwei 1 mm Gele.	79

III. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	BIM	<i>B-cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death</i>
°C	Grad Celsius	bp	Basenpaare
µL	Mikroliter	BSA	<i>bovine serum albumin</i>
µM	Mikromolar	bzw.	beziehungsweise
5-FU	Fluorouracil	Ca ²⁺	Calcium
A	Ampère	CAD	<i>caspase-activated DNase</i>
ABT-263	Navitoclax	CDC2	<i>cell division cycle 2</i>
ADP	Adenosindiphosphat	CDK	Cyclin-abhängige Kinase
AKT	Proteinkinase B	CHK1	<i>Checkpoint Kinase 1</i>
ALL	akute lymphatische Leukämie	CHK2	<i>Checkpoint Kinase 2</i>
AML	akute myeloische Leukämie	CIP	CDK-Inhibitorproteinen
AMPK	AMP aktivierte Kinase	CLL	chronische lymphatische Leukämie
APAF-1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>	CML	chronische myeloische Leukämie
APC	<i>anaphase promoting complex</i>	CRISPR-Cas9	<i>clustered regular interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated</i>
ATG	<i>autophagy related proteins</i>	DC	dendritische Zelle
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia mutated</i>	DDR	DNA-Schadensantwort
ATP	Adenosintriphosphat	dest.	destilliert
ATR	<i>ATM and Rad3 related</i>	DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
BAD	<i>BCL-2-antagonist of cell death</i>	DMSO	Dimethylsulfoxid
BAK	<i>BCL-2-antagonist/killer</i>	DNA	Desoxyribonukleinsäure
BAX	<i>BCL-2-associated X-protein</i>		

DNA-PKcs	<i>DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit</i>	GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat	GTP	Guanosintriphosphat
DSB/DSBs	<i>Doppelstrangbruch/ Doppelstrangbrüche</i>	h	Stunde
DTT	Dithiothreitol	HATs	Histonacetyltransferasen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	HDAC	Histondeacetylase
EGFR	epidermale Wachstumsfaktor	HDACi	Histondeacetylasen-Inhibitor
EMT	epithelial-mesenchymale Transition	HR	Homologe Rekombination
Entinostat	MS-275	HSF-1	Hitzeschockfaktor 1
epi	epithelial	HSP70i	HSP70-Inhibitor
ERK	extrazellulär-signalregulierte Kinasen	HSPs	Hitzeschockproteine
ESB/ESBs	Einzelstrangbruch/ Einzelstrangbrüche	HU	Hydroxyurea
EtOH	Ethanol	IAPs	<i>inhibitors of apoptosis</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>	IF	Immunfluoreszenz
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>	IGFR	insulinähnlicher Wachstumsfaktor
FCS	<i>fetal calf serum</i>	IL-1	Interleukin-1
FGFR	Fibroblasten Wachstumsfaktor	IPMN	intraduktale papilläre muzinöse Neoplasma
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat	IT	Irinotecan
FK228	Romidepsin	ITH	intratumorale Heterogenität
Fol	Folinsäure	JNKs	Jun-amino-terminale Kinasen
g	Gramm	LC3	<i>light chain 3</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>	M	Molar
		mA	Milliampère
		MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
		MAPKK	MAP Kinase Kinase

MAPKKK	MAP Kinase Kinase	Kinase Kinase	NHEJ	<i>non-homologous DNA end joining</i>
MCL-1	<i>myeloid cell leukemia 1</i>		NK	natürliche Killerzellen
MCM	<i>Minichromosome Maintenance</i>		nM	Nanomol
MCN	muzinöse Neoplasma	zystische	nm	Nanometer
MDM2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>		OX	Oxaliplatin
MDM4	<i>mouse double minute 4 homolog</i>		p-	phosphoryliert
mes	mesenchymal		PanIN	intraepitheliale Pankreasneoplasie
MGMT	<i>O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase</i>		PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
min	Minute		PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
MK-1775	Adavosertib		PD	<i>1,10-Phenanthrolin-5,6-dion, Phendion</i>
mM	Millimol		PDAC	<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
MOMP	<i>mitochondrial membrane permeabilisation</i>	<i>outer</i>	PDK1	<i>phosphoinositide dependent protein kinase-1</i>
MPF	<i>mitosis-promoting factor</i>		Pen	Penicillin
MRN-Komplex	MRE11-RAD50-NBS1-Komplex		PI	Propidiumiodid
mRNA	<i>messenger RNA</i>		PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
MSH2	<i>MutS homolog 2</i>		PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
NAD+	Nicotinamidadenin-dinukleotid		PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
NBD	N-terminale ATP-Bindungsstelle		PLK1	<i>Polo-like Kinase 1</i>
NEF	<i>nucleotide exchange factor</i>		PMN	Granulozyten, <i>polymorphonuclear leukocytes</i>
ng	Nanogramm		pmol	picomol

PP2A	Proteinphosphatase 2A	s.	siehe
PS	Phosphatidylserin	SBD	Substrat-Bindungsstelle
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>	SDS-PAGE	<i>sodium dodecylsulfate-Polyacrylamid Gel Electrophoresis</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>	Ser	Serin
qPCR	quantitative Polymerasenkettenreaktion	sgRNA	<i>single guide RNA</i>
RAS	<i>rat sarcoma</i>	SILAC	<i>stable isotope labelling with amino acids in cell culture</i>
RKI	Robert-Koch-Institut	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
RNA	Ribonukleinsäure	ssDNA	Einzelstrang – DNA
RNAi	RNA-Interferenz	Strep	Streptomycin
RNR	Ribonukleotid-Reduktase	Thr	Threonin
rNTP	Ribonukleotidtriphosphat	TOP-1	Topoisomerase-1
RPA	<i>replication protein A</i>	Tyr	Tyrosin
RPE-1	<i>Human Retinal Pigment Epithelial-1</i>	U/min	Umdrehungen pro Minute
rpm	<i>revolutions per minute</i>	ULK1	<i>Unc-51 - like Kinase 1</i>
RRM1	<i>ribonucleotide reductase regulatory subunit M1</i>	UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
RRM2	<i>ribonucleotide reductase regulatory subunit M2</i>	V	Volt
RS	Replikationsstress	VPA	Valproinsäure
RT	Raumtemperatur	WHO	<i>World Health Organization</i>
RTKs	Rezeptortyrosinkinasen	x g	vielfaches der Erdbeschleunigung
		z.B.	zum Beispiel

IV. Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse (PDAC) ist eine äußerst aggressive Tumorerkrankung, die mit einer schlechten Prognose einhergeht. Die 5-Jahres-Überlebensrate für diese Krebsart hat sich in den letzten Dekaden kaum verbessert. Daher bleibt das PDAC weltweit ein ungelöstes klinisches Problem. Es ist somit von besonderem Interesse, eine gezielte Therapiemöglichkeit für diese Krebserkrankung zu finden. Um dies zu bewerkstelligen, ist eine molekulare Charakterisierung der PDAC Subtypen notwendig. So können behandlungsspezifische Vulnerabilitäten identifiziert werden.

In dieser Dissertation werden verschiedene Proteine in murinen PDAC Zelllinien durch spezifische Inhibitoren blockiert und somit direkt angesprochen.

Die Hemmung der *de novo* dNTP-Synthese durch den Ribonukleotid-Reduktase Inhibitor (RNRi) Hydroxyurea (HU) bewirkt eine Induktion der Apoptose im murinen PDAC Zellsystem, wobei der Masterkinase ATM in diesen HU-behandelten Zelllinien eine pro-apoptotische Rolle zugesprochen wird. Eine Kombination mit dem Histondeacetylase-Inhibitor (HDACi) MS-275 steigert den HU-bedingten DNA-Replikationsstress, welcher mit einer gesteigerten Expression der PP2A-Untereinheit PR130/*PPP2R3A*, sowie einer Expressionsabnahme der RNR Untereinheit RRM2 und des DNA-Reparaturproteins RAD51 einhergehen. Im direkten Vergleich mit dem neuartigen RNRi COH29 und dem Topoisomerase-1 Inhibitor Irinotecan (IT), ist HU hinsichtlich der Induktion von Apoptose und DNA-Replikationsstress weitaus überlegen. Diese Daten zeigen neue Einblicke in ein zytotoxisches, ATM-reguliertes und HDAC-abhängiges Replikationsstressprogramm in murinen PDAC Zellen.

Onkogene Signalkaskaden sind in vielen Tumoren, einschließlich im PDAC, mutiert. Dabei können Kinasen über Proteinphosphorylierungen, sowie Phosphatasen über Proteindephosphorylierungen, die Entstehung von Krebszellen und deren Therapieresistenz antreiben. Obwohl die Funktionen von Phosphatasen in Tumoren weitgehend unerforscht sind, gibt es erste Hinweise darauf, dass Phosphatasen vielversprechende Ansatzpunkte für neuartige therapeutische Maßnahmen darstellen.

Die Proteinphosphatase 2A (PP2A) ist ein heterotrimeres Enzym, welches in vielen zellulären Prozessen wie der DNA-Reparatur, Apoptose, Autophagie und Zellproliferation beteiligt ist. Diese Serin/Threonin-Phosphatase besteht aus der strukturellen Untereinheit PP2A-A, der katalytischen Untereinheit PP2A-C und der regulatorischen Untereinheit PP2A-B. Eine erhöhte Expression von PR130, welche eines der regulatorischen Untereinheiten von PP2A ist, korreliert mit der Aggressivität des PDACs und schlechteren Überlebenschancen der PatientInnen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der PP2A-Inhibitor Phendion (PD) in mesenchymalen murinen und in humanen PDAC Zellen einen proteasomalen Abbau von PR130 auslöst, welche mit der Induktion des Hitzeschockproteins (HSP) 70 und der Akkumulation von Proteinaggregaten einhergeht. Diese Effekte sind toxisch und spiegeln sich in hohen Apoptoseraten wider. Darüber hinaus leitet PD die Apoptose in PDAC Zellen unabhängig von dem Tumorsuppressor p53 ein. Die Transfektion der PDAC Zelllinien mit einer siRNA erlaubt einen transienten *knockdown* von PR130, wodurch diese Zellen gegenüber PD sensitiviert werden. Diese Daten legen nahe, dass der PP2A-PR130-Komplex Proteine dephosphoryliert und dadurch die Bildung von Proteinaggregaten in Tumorzellen verhindert. Die Wirkung des neuartigen PP2Ai PD wird im Rahmen dieser Arbeit auch in verschiedenen Leukämiezellen, in *human Retinal Pigment Epithelial-1* (RPE-1) und in normalen Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) untersucht.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit zeigt, dass der Zellzyklus und seine Übergangspunkte in PDAC und in leukämischen Zellen therapeutisch angegriffen werden können. Die Kombination aus PD und dem WEE1-Kinase-Inhibitor Adavosertib (MK-1775) resultiert in hohen Apoptoseraten und einer Anhäufung des Stressmarkers γ -H2AX. Die Applikation beider Inhibitoren unabhängig voneinander führt zu einem G2/M-Arrest. Die Doppelbehandlung mit PD und MK-1775 resultiert in einer mitotischen Katastrophe, die in PDAC Zellen durch die abnormale Struktur von α -Tubulin und einer signifikanten Abnahme der *Polo-like Kinase 1* (PLK1) belegt werden können.

Zusammengenommen wurden in dieser Arbeit unterschiedliche vielversprechende Therapieansätze für PDAC gefunden, die möglicherweise für die weitere klinische Forschung innovativ sein könnten.

V. Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is an extremely aggressive tumor disease that is associated with a poor prognosis. The 5-year survival rate for this type of cancer has barely progressed in recent decades, therefore PDAC remains an unsolved clinical problem worldwide. It is becoming increasingly important to find targeted therapy for this cancer. To accomplish this, molecular characterization of PDAC subtypes is needed to identify treatment-specific vulnerabilities.

In this dissertation, various proteins and their associated molecular signaling pathways are blocked by specific inhibitors and thereby directly addressed.

Inhibition of *de novo* dNTP synthesis by the ribonucleotide reductase inhibitor (RNRi) hydroxyurea (HU) shows an induction of apoptosis in the murine PDAC cell system, whereby ATM is considered to perform a pro-apoptotic role in these HU-treated cells. The combination with the inhibitor of histone deacetylase (HDACi) MS-275 promotes HU-induced DNA replication stress, which is associated with an increase in the PP2A subunit PR130/PPP2R3A, as well as a decrease in the RNR subunit RRM2 and in the DNA repair protein RAD51. In head-to-head comparison with the novel RNRi COH29 and the topoisomerase-I inhibitor irinotecan (IT), HU is significantly more potent in inducing apoptosis and DNA replication stress than these inhibitors. These data provide new insights into a cytotoxic, ATM-regulated and HDAC-dependent replication stress program in murine PDAC cells.

The oncogenic signaling cascades are mutated in many tumors, including PDAC. Kinases and phosphatases can drive the development of cancer cells and their resistance to therapy via protein phosphorylation or dephosphorylation. Although the functions of phosphatases in tumors are largely unexplored, there are initial indications that phosphatases represent promising targets for novel therapeutic interventions.

Protein phosphatase 2A (PP2A) is a heterotrimeric enzyme involved in many cellular processes such as DNA repair, apoptosis, autophagy, and cell proliferation. This serine/threonine phosphatase consists of the structural subunit PP2A-A, the catalytic subunit PP2A-C, and the regulatory subunit PP2A-B. Increased expression of PR130, one of the regulatory subunits of PP2A, correlates with PDAC aggressiveness and poor overall survival rates of the patients.

The results of this work demonstrate that the PP2A inhibitor phendione (PD) induces proteasomal degradation of PR130 in murine mesenchymal and human PDAC cells, linked to an induction of heat shock protein (HSP) 70 and promoting the accumulation of protein aggregates. These effects are toxic, reflected in high apoptosis rates. Additionally, PD induces apoptosis in PDAC cells independently of the frequently mutated tumor suppressor p53. Transfection of PDAC cell lines with siRNA allows the genetic silencing of PR130, sensitizing these cells to PD. These data suggest that the PP2A-PR130 complex dephosphorylates proteins and thereby prevents the formation of protein aggregates in tumor cells. The effect of the novel PP2Ai PD is also shown in various leukemia cells, in human retinal pigment epithelial-1 (RPE-1) and in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

Another part of this work shows that the cell cycle and its transition points can be manipulated and targeted in PDAC and leukemic cells. The combination of PD and the WEE1 kinase inhibitor adavosertib (MK-1775) shows promising results in these cells, demonstrated by high apoptosis rates and an accumulation of the stress marker γ -H2AX. The application of both inhibitors separately leads to G2/M arrest. The combination of PD and MK-1775 results in a mitotic catastrophe, proven in PDAC cells by the abnormal structure of α -tubulin and a significant decrease of the polo like kinase PLK1.

1. Einleitung

1.1. Die Entstehung von Krebs

Krebs beschreibt in der Medizin einen Zustand der unkontrollierten Proliferation von Zellen. Dabei ist dieser Zustand auf verschiedene Mutationen des Erbguts zurückzuführen. Es können Duplikations-, Punkt-, Deletions- und Insertionsmutationen, sowie Chromosomenaberrationen und Gen-Amplifikationen auftreten [1-4]. Laut der *World Health Organization* (WHO) können der Konsum von Tabak und Alkohol, sowie eine ungesunde Ernährung verbunden mit Bewegungsmangel, Luftverschmutzung und UV-Strahlung [5], die Entstehung von Krebs begünstigen (WHO).

Durch die Replikation der mutierten DNA können unter anderem wachstumshemmende Signale übergangen werden, was den Krebszellen eine uneingeschränkte Proliferation ermöglicht [6]. Tumorzellen haben demnach eine höhere Mitoserate als gesunde Zellen (WHO). Das führt dazu, dass benachbartes Gewebe infiltriert und Metastasen gebildet werden [7]. Diese Art von Tumor wird als bösartig oder auch als Malignom bezeichnet.

Es gibt verschiedene Arten, Tumore zu bekämpfen, wie z.B. eine Strahlentherapie, eine operative Resektion oder eine Chemotherapie. Während die operative Entfernung des Tumors oder die Strahlentherapie lokale Maßnahmen sind, richtet sich die Chemotherapie gegen alle Zellen des Körpers. Dabei sind insbesondere Zellen betroffen, die eine höhere Teilungsrate besitzen. Da bei der Chemotherapie die Proliferation von Krebszellen vermindert wird, werden die eingesetzten Substanzen als Zytostatika bezeichnet [8].

Die Prognose und die Überlebensrate der Betroffenen sind dabei nicht nur von der Art des Tumors abhängig, sondern auch davon in welchem Stadium der Tumor diagnostiziert wurde. Es ist und bleibt eine dringende und notwendige Aufgabe der Krebsforschung an einer stetigen Verbesserung der Diagnostik und Therapiemöglichkeit zu arbeiten, um den steigenden Zahlen der Krebserkrankung entgegenzuwirken.

1.1.1. PDAC (*Pancreatic ductal adenocarcinoma*)

Bauchspeicheldrüsenkrebs zählt als dritthäufigste Krebstodesursache [9], wobei das Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse die aggressivste Form ist und zusätzlich mit der schlechtesten Überlebensrate aller malignen Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts verbunden ist [10]. Trotz allem ist PDAC die häufigste Form von Bauchspeicheldrüsenkrebs, wobei der Tumor sich häufig am Kopf der Bauchspeicheldrüse befindet [11]. Befinden sich die Tumore zentral oder im unteren Ende der Bauchspeicheldrüse, so nimmt die Überlebensrate zusätzlich ab [12].

Bei dieser Erkrankung sind vor allem Männer im Alter von 40-85 Jahren betroffen [13], wobei die 5-Jahres-Überlebensrate unabhängig vom Geschlecht bei 12 % liegt [9, 14]. Die niedrige 5-Jahres-Überlebensrate von PDAC ist auf die problematische Diagnostik zurückzuführen, denn eine Diagnose im frühen und heilbaren Stadium ist bei dieser Krebserkrankung äußerst selten. Die betroffenen PatientInnen zeigen erst schmerzhaftes Symptome, sobald der Tumor Metastasen gebildet und das umliegende Gewebe infiltriert hat [15, 16]. Zu dem kann die Symptomatik sehr unspezifisch sein, denn die Betroffenen leiden oftmals unter Bauchschmerzen, Rückenschmerzen, Gewichtsverlust oder Gelbsucht [17]. Es wurde gezeigt, dass PatientInnen mit PDAC in seltenen Fällen auch Typ 2 Diabetes [18] oder eine thromboembolische Erkrankung [19] entwickeln können. Bis eine erfolgreiche Diagnose eines Pankreaskarzinoms gestellt werden kann, zeigen bereits 50 % der PatientInnen eine Metastasierung [20]. Um PDAC zu behandeln werden klassische Behandlungsmethoden angewandt, wie Chemotherapie, eine R(0)-Resektion oder eine Bestrahlung [10]. Durch die oft späte Diagnose sinkt die Chance auf eine vollständige operative Entfernung auf 15-20 % [21]. In 80-85 % der PatientInnen mit fortgeschrittenem PDAC wird eine Therapie nach dem FOLFIRINOX Schema angewendet [22, 23]. Dabei werden die DNA-schädigenden Chemotherapeutika Folinsäure (Fol), Fluorouracil (5-FU), Irinotecan (IT) und Oxaliplatin (OX) verabreicht. Diese Kombinationstherapie zeigte bereits eine signifikante Verlängerung der Lebenszeit, bringt jedoch auch schwerwiegende Nebenwirkungen mit sich. Dazu zählen unter anderem Müdigkeit, Diarrhoe und Übelkeit [24, 25]. Bei PDAC PatientInnen wurde auch die leicht modifizierte Kombinationsbehandlung FOLFOXIRI (Fol, 5-FU, IT, OX) angewendet, welche sich in metastasierenden Kolonkarzinomen als wirksam erwies [23, 26].

Hierbei wird eine niedrigere Dosis an Irinotecan verwendet, was zu einer erheblichen Reduktion der toxischen Effekte dieser Behandlung beiträgt. Es stellte sich jedoch heraus, dass FOLFOXIRI im Vergleich zu FOLFIRINOX keine therapeutischen Vorteile mit sich bringt [23]. Als *First-Line*-Therapie wird außerdem noch Albumin gebundenes (*nanoparticle albumin bound, nab*) -Paclitaxel oder Gemcitabin verwendet. Die Wirksamkeit von Gemcitabin entspricht der von FOLFIRINOX, jedoch mit schwächeren Nebenwirkungen. Deshalb wird in der Regel nach einer Operation zunächst eine Behandlung mit Gemcitabin angestrebt. Bei auftretenden Unverträglichkeiten erfolgt dann ein Wechsel zu FOLFIRINOX.

Trotz der erforschten Therapien, spricht PDAC nur begrenzt (20-30 %) auf diese Behandlungen an, wodurch diese Erkrankung meistens tödlich endet [27, 28]. Zudem tragen die auftretenden Nebenwirkungen zu einer beachtlichen Einschränkung der Lebensqualität bei [22]. Aus diesen Gründen besteht ein dringender Bedarf an innovativen Therapieansätzen zur Behandlung von PDAC.

Die zelluläre Heterogenität des PDACs ist eine Besonderheit, welche ebenfalls dazu beiträgt, dass diese schlecht auf Chemotherapien ansprechen. Es wird hierbei zwischen einer intertumoralen und einer intratumoralen Heterogenität unterschieden. Während die intertumoralen Heterogenität die Unterschiede von PDAC Tumoren zwischen den PatientInnen beschreibt, beschreibt die intratumorale Heterogenität (ITH) das Auftreten von genetischen Subklonen innerhalb eines Tumors und die damit verbundene Resistenz der PDAC Zellen auf bestimmte Behandlungen. Letzteres stellt die Schwierigkeit einer erfolgreichen Behandlung von PDAC Tumoren dar [29]. Die ITH wurde sowohl durch Karyotypisierung [30] als auch durch eine DNA-Sequenzierung [31, 32] nachgewiesen.

Die RAS (*rat sarcoma*) Onkogene (HRAS, KRAS und NRAS) sind in humanen Krebszellen am häufigsten mutiert. Dabei wurde festgestellt, dass in Lungen-, Darm- und Bauchspeicheldrüsenkrebs diese Mutationen häufiger auftreten als in anderen Krebserkrankungen [33]. Außerdem konnte die Isoform KRAS in fast allen PDACs gefunden werden, was eine starke Abhängigkeit dieser Krebserkrankung zu den RAS Genen aufzeigt [33]. Es ist derzeit noch unklar, weshalb in PDAC ausschließlich KRAS mutiert ist.

Derzeit gibt es keine zielgerichteten Therapien für PDAC, da die Zellen des duktales Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse nahezu nur nicht-behandelbare KRAS Mutationen exprimieren [33]. Die behandelbare KRAS^{G12C}-Mutation ist nur in 1-3 % der PDAC Tumore vertreten. Eine Behandlung dieser KRAS^{G12C}-Mutation mit dem Inhibitor AMG-510 zeigte vielversprechende Resultate in Lungenkarzinomen [34].

Die Entstehung von PDAC beruht auf der Entwicklung aus definierten Vorläuferläsionen [35]. Die häufigste Vorläuferläsion ist die intraepitheliale Pankreasneoplasie (PanIN). Zusätzlich existieren zwei weitere Vorläuferläsionen: das intraduktale papilläre muzinöse Neoplasma (IPMN) und das muzinöse zystische Neoplasma (MCN) [36]. Dabei ist unklar, ob sich aus jeder dieser Vorläuferformen zwangsläufig ein maligner Tumor entwickelt. Es wurde gezeigt, dass eine Subpopulation der PanIN [37] vermehrt das Protein *doublecortin like kinase 1* und acetyliertes Tubulin exprimieren, welche eine tumor-initiiierende Rolle zugesprochen wird [38]. Außerdem konnten in diesen Zellen Krebsstammzellmarker wie CD133 oder CD24/CD44/ESA nachgewiesen werden [38-40].

In einer Studie aus 2012 wurde gezeigt, dass bestimmte Subpopulationen der prämaligen Zellen des duktales Adenokarzinoms eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) durchlaufen [41], wobei der mesenchymale Subtyp mit einer aggressiveren Metastasenbildung und einer erhöhten Chemoresistenz verbunden ist [42, 43]. EMT ist kein krebsspezifisches Programm, da Typ I EMT zuständig für die Implantierung, Embryogenese und Organentwicklung ist. Der Typ II EMT ist maßgeblich beteiligt an den Prozessen der Wundheilung, Geweberegeneration und Organfibrose. In Krebszellen führt die EMT zu einer Reaktivierung des embryonalen Entwicklungsprogramms und ist somit verantwortlich für die Bildung von Metastasen, es handelt sich hierbei um EMT vom Typ III [44, 45]. Bekannte Markerproteine für epitheliale Zellen sind E-Cadherin und α -Catenin. Für mesenchymale Zellen kann entweder N-Cadherin, Vimentin oder β -Catenin als Markerprotein detektiert werden. Die genannten Proteine sind in den jeweiligen Zelltypen überexprimiert [46].

1.1.2. Die Zellen des Immunsystems und die Bildung von Leukämiezellen

Die Bildung von Blutzellen beginnt im Knochenmark aus Blutstammzellen. Dieser Prozess wird Hämatopoese genannt [47, 48]. Je nach Funktion und Aufgabe differenzieren die Stammzellen zu ihrer funktionstüchtigen Form und werden anschließend in die Blutbahn entlassen (**Abb. 1**).

Die Stammzellen entwickeln zunächst Vorläuferzellen, aus denen die einzelnen Zellarten entstehen. Man unterscheidet grundsätzlich zwischen einer myeloischen und einer lymphatischen Vorläuferzelle. Aus einer myeloischen Vorläuferzelle können sich Thrombozyten, Erythrozyten, Granulozyten (*polymorphonuclear leukocytes*, PMN), Mastzellen und Monozyten entwickeln, wobei die Monozyten die Vorläuferzellen der Makrophagen und der dendritischen Zellen (DC) sind. Aus einer lymphatischen Vorläuferzelle können zum einen die T- und B-Zellen entstehen, zum anderen können sich daraus auch natürliche Killerzellen (NK) entwickeln [49, 50].

Erythrozyten werden auch rote Blutkörperchen genannt, da sie den Blutfarbstoff Hämoglobin tragen und für den Sauerstofftransport im Blut zuständig sind. Darüber hinaus sind Erythrozyten nicht mehr teilungsfähig, da sie keinen Nukleus und keine Organellen besitzen [51]. Leukozyten repräsentieren die weißen Blutkörperchen, die so genannt werden, da sie nicht den roten Blutfarbstoff Hämoglobin tragen. Diese Zellen besitzen einen Zellkern und sind die zentralen Bestandteile der humanen Immunabwehr, welche wiederum in die unspezifische und die adaptive Immunabwehr unterteilt werden [52-56]. Zu den Leukozyten gehören Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten, Mastzellen und DC [51].

Die unspezifische Immunabwehr ist angeboren und reagiert sehr schnell gegen Erreger, die als körperfremd eingestuft werden. Zu den Zellen der unspezifischen Immunabwehr gehören Granulozyten, Monozyten, DC, Mastzellen und Makrophagen. Die Erreger oder der Fremdkörper werden verdaut und durch Phagozytose beseitigt [57]. Die adaptive oder auch die spezifische Immunabwehr zeichnet sich durch ihre große Anpassungsfähigkeit aus, die auch durch die Ausbildung von Gedächtniszellen gekennzeichnet ist. Die wichtigsten Bestandteile der spezifischen Immunabwehr sind die T- und B-Zellen. Diese gehören zu den Lymphozyten und reifen im Gegensatz zu den anderen Zellarten nicht im Knochenmark, sondern erst im lymphatischen Gewebe heran.

1. Einleitung

B-Zellen können durch körperfremde Antigene aktiviert werden, wodurch sie zu Gedächtniszellen und Antikörper produzierenden Plasmazellen differenzieren. T-Zellen tragen auf der Zelloberfläche T-Zell-Rezeptoren, mit denen Antigene erkannt werden [58]. Sind T-Zellen überaktiv, so greifen sie unabhängig von einem Infektionsausbruch, die körpereigenen Zellen und das zentrale Nervensystem an. So entsteht beispielsweise die Autoimmunkrankheit Multiple Sklerose [59, 60].

Wird die Reifung und Differenzierung einzelner Blutzellen durch eine Fehlregulation der Kontrollgene beeinflusst, so können keine funktionstüchtigen Blutzellen mehr produziert werden, wodurch die unterschiedlichen Funktionen nicht mehr ausgeführt werden können. In den meisten Fällen sind Leukozyten davon betroffen, wodurch das Immunsystem stark angegriffen wird. Die fehlgebildeten Leukozyten (= Blasten) werden in die Blutbahn entlassen, vermehren sich unkontrolliert und verdrängen allmählich die Bildung von funktionstüchtigen Blutzellen [61, 62]. In diesem Fall spricht man von einer Leukämie oder auch Blutkrebs [63]. Typische Symptome für die Leukämie sind Blutarmut (Anämie) [64], erhöhte Infektionsgefahr [65] und starke Blutungsneigung durch eine Gerinnungsstörung [66, 67].

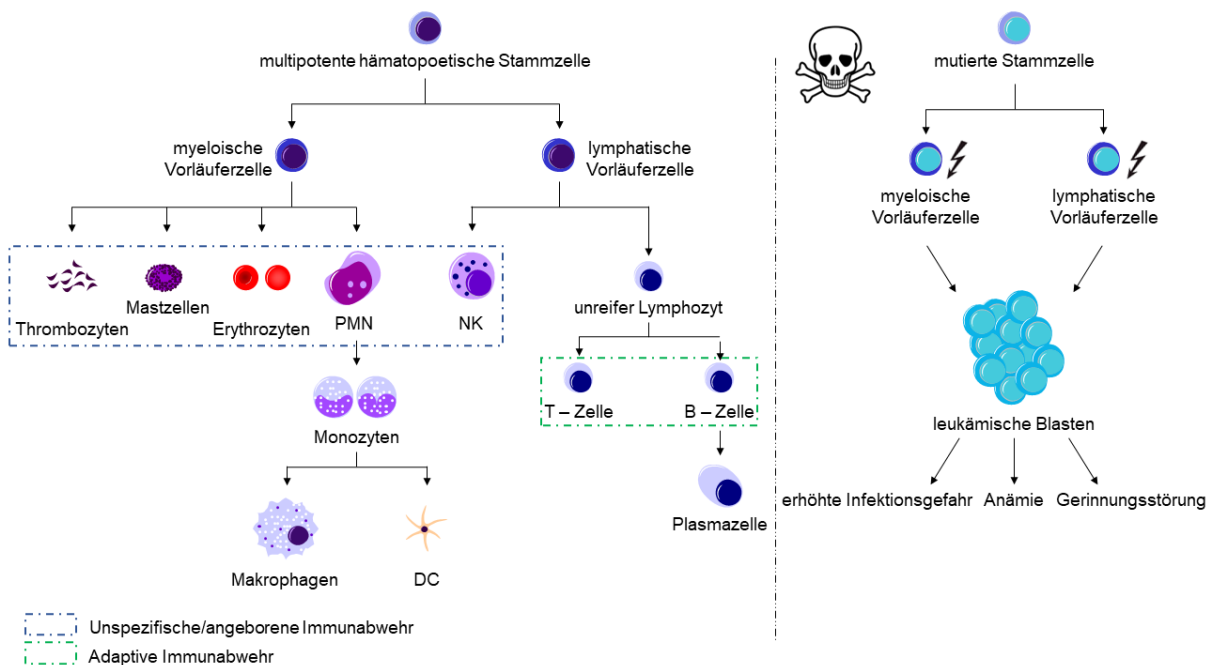


Abbildung 1: Hämatopoese von gesunden Blutzellen (links) und von Leukämiezellen (rechts). Diese graphische Darstellung wurde mit den Informationen aus den Quellen [49, 50, 52-56, 61-66] selbst erstellt.

Leukämiezellen können sich entweder aus den myeloischen oder lymphatischen Vorläuferzellen bilden [68]. Man unterscheidet außerdem zwischen einer chronischen und einer akuten Leukämie. Bei einer akuten Erkrankung kann die Krankheit innerhalb von wenigen Wochen zum Tode führen, wenn diese nicht rechtzeitig erkannt und behandelt werden. Bei einem chronischen Verlauf bleibt die Krankheit in den meisten Fällen für eine lange Zeit unentdeckt, da die Symptome oft schwächer und schleichend sind. Aufgrund dieser Unterscheidungen können vier Hauptklassen der Leukämie beschrieben werden: die akute lymphatische Leukämie (ALL), die chronische lymphatische Leukämie (CLL), die akute myeloische Leukämie (AML) und die chronische myeloische Leukämie (CML) [69, 70].

Wie bei anderen Krebsarten wird Leukämie auch durch Zytostatika oder ionisierende Strahlung behandelt. Je nach Art der Erkrankung, Alter und Zustand des PatientInnen gibt es verschiedene Behandlungsmethoden mit unterschiedlicher Heilungschance. Eine rechtzeitige Entdeckung und Behandlung von AML führt in 50-60 % der Fälle zu einer kompletten Remission [71, 72], während bei einer CML zu 90 % eine vollständige Remission eintreten kann [73, 74].

1.2. Posttranslationale Modifikationen von Proteinen

Proteine können nach ihrer Synthese modifiziert werden. Man spricht hierbei von einer posttranslationalen Modifikation der Proteine, wobei Phosphorylierungen, Lipidierung und Glykosylierung am häufigsten auftreten. Darüber hinaus kann es auch zu einer Acetylierung, Ubiquitinierung oder Methylierung der Proteine kommen [75]. Phosphorylierungen werden durch Proteinkinasen durchgeführt, welche unter ATP-Verbrauch Phosphatgruppen auf Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste reversibel übertragen. Daher werden Kinasen in die Klassen der Serin/Threonin- und Tyrosinkinase unterteilt [76]. Durch eine Phosphorylierung kann die Funktion des Proteins modifiziert werden, wobei es zu einer Aktivierung oder Deaktivierung des Proteins kommen kann.

Die bekanntesten Ser/Thr-Kinasen sind *Ataxia Telangiectasia mutated* (ATM), *ATM and Rad3 related* (ATR), *Checkpoint Kinase 1* (CHK1), *Checkpoint Kinase 2* (CHK2), MAPK (extrazellulär-signalregulierte Kinasen, ERK1/2), PKB (AKT1/2/3), sowie die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs). Ein bekannter Vertreter der Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) ist das FLT-3, welches in vielen AML Zellen mutiert und für den tödlichen Verlauf verantwortlich ist [77]. In vielen Krebsarten sind Kinasen dysreguliert [78], wodurch zahlreiche Kinase-Inhibitoren entwickelt und analysiert wurden [79-81].

1.2.1. Proteinphosphatase 2A

Der Gegenspieler der Proteinkinase ist die Proteinphosphatase. Diese spalten hydrolytisch die Phosphatgruppen von vielen physiologisch wichtigen Proteinen. Da bereits viel an Proteinkinasen geforscht wurden, aber nur wenig über die Wirkung und Funktionen von Phosphatasen als therapeutisches Ziel bekannt ist, rücken diese immer mehr in den Fokus der Krebsforschung. Dabei ist das therapeutische Potenzial noch nicht voll ausgeschöpft [82].

Die Proteinphosphatase 2A (PP2A) ist ein heterotrimeres Enzym, welches in vielen zellulären Prozessen wie der DNA-Reparatur, Apoptose, Autophagie und Zellproliferation beteiligt ist [83-85]. Diese Ser/Thr-Phosphatase besteht aus drei Untereinheiten: die gerüstbildende Untereinheit PP2A-A, die katalytisch aktive Untereinheit PP2A-C und die regulatorische Untereinheit PP2A-B. Der jetzige Stand der Forschung beschreibt vier verschiedene Klassen von Untereinheiten des B-Typs, die mindestens 24 weitere verschiedene Isoformen und Spleißvarianten enthalten. Aufgrund dieser Vielfalt bestimmt die regulatorische Untereinheit die Substratspezifität (**Abb. 2**). Das in dieser Dissertation im Fokus stehende Protein PR130 (B^{α1}), ist eine Isoform der regulatorischen Untereinheit PP2A-B und leitet sich ebenso wie das PR72 (B^{α2}) von dem Gen *PPP2R3A* ab. Dabei ist PR72 nur im Herz- und Skelettmuskelgewebe vertreten [83], wohingegen PR130 in verschiedenen Gewebsarten exprimiert wird. Zusätzlich ist PR130 an der Steuerung tumorrelevanter Funktionen in diversen Krebszellen beteiligt, da das Schicksal von Zellen bei replikativem Stress über PR130 gesteuert wird [86].

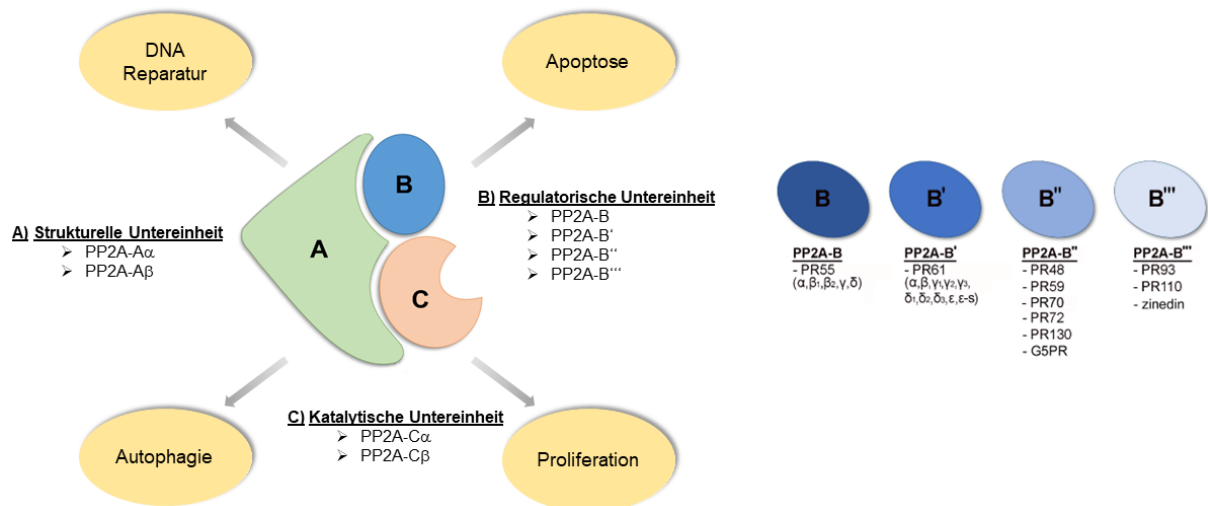


Abbildung 2: **Relevante Funktionen und Untereinheiten der Proteinphosphatase 2A.** Die Mitglieder der regulatorischen Untereinheit PP2A-B sind detailliert dargestellt; PR130 gehört zu der regulatorischen Untereinheit von PP2A. Diese graphische Darstellung wurde mit den Informationen aus der Quelle [83] selbst erstellt.

Die Kinasen CHK1 oder CHK2 können durch PP2A dephosphoryliert und somit deaktiviert werden [87, 88]. Auch eine Interaktion zwischen PP2A und der Masterkinase ATM wurde in Lymphoblastenzellen beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass die Untereinheiten PP2A-A und PP2A-C in der Lage waren, eine Phosphorylierung von ATM an Ser1989 in normal proliferierenden Zellen zu unterdrücken [89]. Bei der Induktion der DDR, dissoziieren die PP2A Untereinheiten, wodurch eine Autophosphorylierung von ATM an Ser1989 stattfindet und die Rekrutierung weiterer Proteine in der Signalkaskade ermöglicht [89]. Somit ist PP2A in der Lage die DDR zu modulieren.

Eine Dysregulation von PP2A stand häufig im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, diversen Autoimmunkrankheiten und Krebserkrankungen [90-94]. In humanen Krebszellen liegt einerseits die Vermutung nahe, dass PP2A ein Tumorsuppressorgen ist, da dieses häufig inaktiv ist [94]. Andererseits war PP2A-C in einem Mausmodell überexprimiert und stand im direkten Zusammenhang mit der Anzahl und Größe von Tumoren. Dieser Befund deutet auf die onkogene Funktion von PP2A hin [95, 96]. In mehreren Krebserkrankungen korreliert eine höhere Expression der regulatorischen Untereinheit mit der Aggressivität der Tumoren. So wurde bei Magenkrebs eine erhöhte Expression von PPP2R2D nachgewiesen. In Leberkarzinomen lag eine Überexprimierung an PPP2R3A/PR130 vor [96-100].

In PDAC Karzinomen wurde ein Zusammenhang zwischen der PPP2R3A-mRNA-Expression und der Überlebenschance von den betroffenen PatientInnen beschrieben, wobei eine Überexprimierung von PR130 mit einer schlechten Prognose verbunden ist [101].

In Kolonkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass PR130 die PP2A-abhängige Dephosphorylierung von ATM fördert, wobei die Aktivität von PR130 selbst von den Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2 negativ reguliert wird. Die Verwendung eines HDAC Inhibitors (HDACi) in HCT116 Zellen zeigte bereits, dass eine Phosphorylierung von ATM unterdrückt und eine Phosphorylierung von CHK1 abgeschwächt wurde. Damit die Checkpoint-Signalkaskade in Zellen mit replikativem Stress ordnungsgemäß ablaufen kann, ist die unterdrückte Expression von PR130 durch HDAC1/HDAC2 essenziell (**Abb. 4**) [86].

PPP2R5A, eine weitere regulatorische Untereinheit, wurde in metastatischen PDAC Karzinome beschrieben [102]. Bis heute ist unklar, ob und wie bestimmte PP2A-B Untereinheiten die Karzinogenese beeinflussen. Bisher konnte keine Korrelation zwischen der Expression von bestimmten PP2A-B Proteine in einer bestimmten Tumorart beschrieben werden. Da PP2A in zahlreichen Signalwegen involviert ist und eine hohe Anzahl an Untereinheiten aufweist, ist das Wissen über den genauen Wirkmechanismus von PP2A noch begrenzt [103]. Daher ist die Klärung der Funktionen von PP2A von besonderer Bedeutung und bietet möglicherweise ein attraktives Ziel für eine gezielte therapeutische Behandlung von PDAC.

1.2.2. Histondeacetylasen

Histone sind Proteine, die für die Kondensation und Stabilisation der DNA essenziell sind. Die Faltung der DNA, um sie kompakt in den Nukleus zu verpacken, erfolgt hierbei nicht willkürlich. Die DNA wird um das Histon gewickelt, wobei jeweils acht Histone sich zu einem Nukleosom ausbilden. Kondensieren mehrere Ketten an Nukleosomen, so bilden sich Chromosomen. Die hohe Bindungsaffinität zwischen der DNA und den Histonen beruht auf den unterschiedlichen Ladungen. Während Histone aufgrund ihrer hohen Anzahl von Lysin- und Arginin-Reste positiv geladen sind, ist die DNA aufgrund ihrer Phosphatreste negativ geladen [104]. Histone können reversibel posttranslational modifiziert werden, indem sie acetyliert, methyliert oder phosphoryliert werden.

Durch diese Modifikationen werden Konformationsänderungen ausgelöst [105]. Bei einer Acetylierung der Histone wird eine Acetylgruppe von Histonacetyltransferasen (HATs) auf die Lysinreste der Histone übertragen, wodurch die positive Ladung neutralisiert wird. Dies hat eine Lockerung der kondensierten DNA zur Folge, da die Wechselwirkungen zwischen dem Histon und der DNA abgeschwächt sind. Dieser Vorgang ist bei der Transkription besonders von Bedeutung, da die DNA so zugänglicher für Transkriptionsfaktoren gemacht wird. Die Acetylgruppen werden anschließend von HDACs wieder entfernt, die DNA geht in ihre maximal kondensierte Form zurück und die Transkription wird gestoppt. HDACs übernehmen aufgrund ihrer Funktion eine zentrale Rolle bei der Regulation der Transkription [106], der DNA Reparatur, Apoptose, Autophagie sowie bei der Differenzierung und Proliferation von Zellen [107-113]. Darüber hinaus kann der Zellzyklus, vor allem am G1/S-Übergang, durch HDACs kontrolliert werden [75].

Die Familie der HDACs werden aufgrund ihrer Lokalisation und Struktur in unterschiedliche Klassen unterteilt. Man unterscheidet hier grundsätzlich zwischen den zinkabhängigen Klassen I, II und IV und der NAD⁺ abhängigen Klasse III [114] (**Tabelle 1**). Die HDACs der Klassen I, II und IV verwenden Zn²⁺ zur Polarisierung von Wasser für den nukleophilen Angriff auf die Acetylgruppe in acetylierten Lysinresten [115].

Tabelle 1: Einordnung der HDAC Klassen und Auflistung ihrer Mitglieder.

Klasse	HDACs	Co-Faktor
I	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8	Zn ²⁺
IIa	HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9	Zn ²⁺
IIb	HDAC6, HDAC10	Zn ²⁺
IV	HDAC11	Zn ²⁺
III	SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7	NAD ⁺

In gesunden Zellen besteht ein Gleichgewicht zwischen den HATs und HDACs. In Krebszellen ist dieses Gleichgewicht jedoch gestört und die Expression von HDACs dominiert (**Abb.3A**) [116]. Dies hat zur Folge, dass die Transkription von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen verändert werden [117].

1. Einleitung

Um dem entgegenzuwirken, werden HDACi eingesetzt, welche zu einer Hyperacetylierung von Histonen führt und das Gleichgewicht zwischen HATs und HDACs wiederherstellt (**Abb. 3B**) [118]. Die Expression zahlreicher Proteine werden normalisiert, wodurch im Idealfall die Progression der Krebserkrankung unterdrückt wird [117]. Die Anwendung von HDACi ist nach aktuellem Stand der Krebsforschung vielversprechend [119].

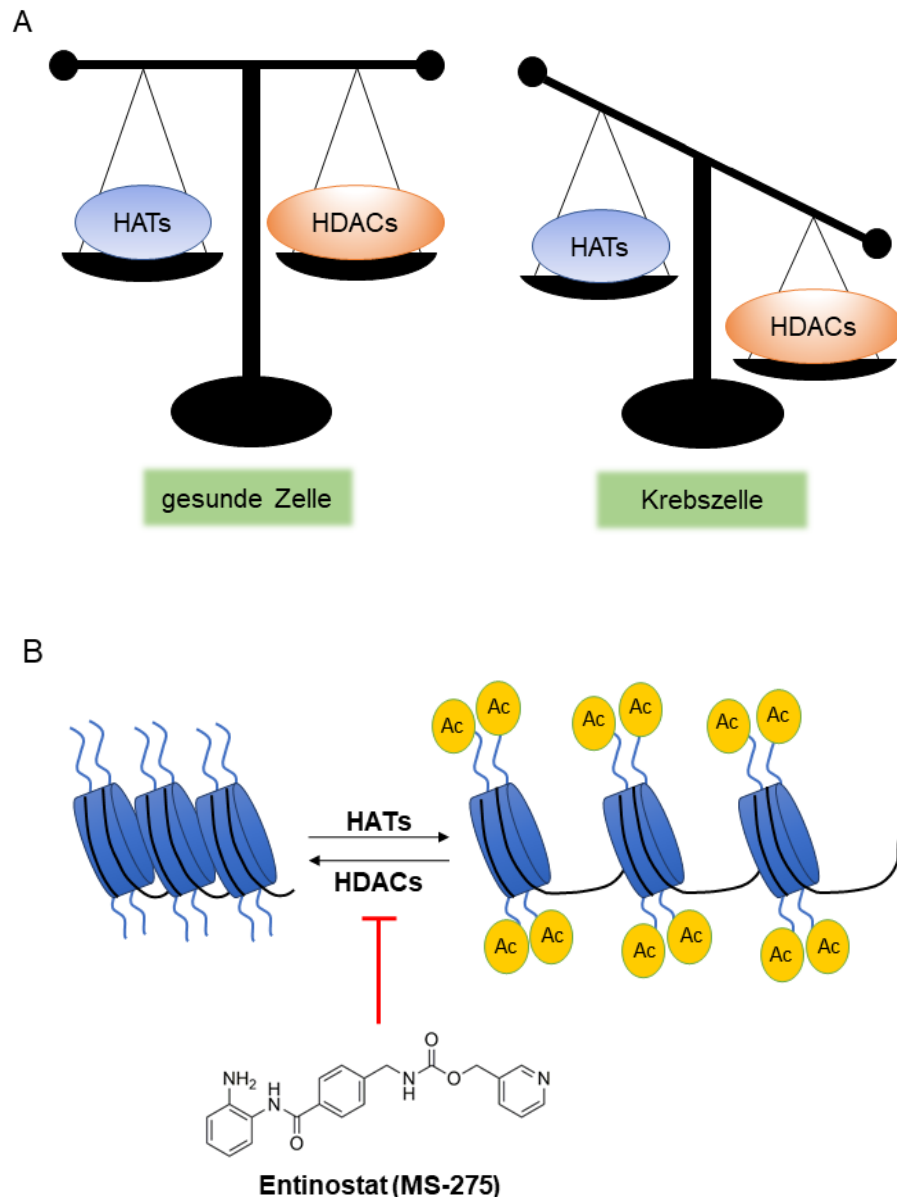


Abbildung 3: **Die Rolle der Histondeacetylase und der Histonacetyltransferase in Zellen.** (A) In Krebszellen dominiert die Anzahl an HDACs und (B) durch die Zugabe von MS-275 kann die HDAC Aktivität geblockt werden. Diese graphische Darstellung wurde mit den Informationen aus den Quellen [116, 117] selbst erstellt.

1.3. DNA-Schadensantwort und DNA-Reparaturmechanismen

Vor allem die Überexpression der Mitglieder der HDAC1 Familie wird meistens in Zusammenhang mit Krebserkrankungen gebracht [117, 120-125]. Diese sind im Zellkern lokalisiert und können durch die Verabreichung von Entinostat (MS-275), Romidepsin (FK228) oder Valproinsäure (VPA) inhibiert werden, wobei VPA ebenfalls die Klasse IIa der HDAC Familie inhibiert [126, 127]. FK228 inhibiert spezifisch HDAC1 und HDAC2 [128-130], während MS-275 selektiv HDAC1 – 3 inhibiert [131]. Durch die HDACi werden zelluläre Prozesse, wie Differenzierung, Zellzyklusarrest oder Apoptose induziert [132]. Darüber hinaus kann eine Inhibierung der DNA-Reparatur beobachtet werden, die zusätzlich durch eine Bestrahlungstherapie oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika zu einer erhöhten Induktion der Apoptose führt [112, 113, 133-136].

Derzeit wird MS-275, ein synthetisches Benzamid-Derivat, in der Behandlung von PatientInnen mit Leukämie, Lymphomen oder soliden Tumoren eingesetzt [137-140].

1.3.1. DNA Schäden und Aktivierung der DNA-Schadensantwort

Das menschliche Genom ist tagtäglich tausenden von DNA Schäden ausgesetzt [141, 142]. Dabei kann es zu einer Blockade der DNA-Replikation oder -Transkription kommen, welche wiederum zur Entstehung von Mutationen führt. Diese genomische Instabilität, sofern sie nicht vollständig repariert werden, ist die Ursache für die Entstehung von degenerativen Krankheiten wie Krebs. Andererseits steht sie jedoch auch für genetische Vielfalt, da bei der evolutionären natürlichen Selektion auftretende Mutationen von Vorteil sein können [143]. Es entstehen hierbei Läsionen unterschiedlichster Art, die ebenfalls verschiedene Auswirkung auf die betroffenen Zellen haben. Um sich vor derartigen Läsionen zu schützen, besitzen Zellen hochkonservierte und komplexe Mechanismen, die bei Bedarf aktiviert werden, um Schäden zu detektieren und zu reparieren [144]. Dieser Vorgang wird im Allgemeinen als *DNA damage response* (DDR) bezeichnet [142, 145].

1. Einleitung

Die Schäden an der DNA-Doppelhelix können entweder nur in einem oder in beiden Strängen auftreten. Dabei können Basen oder ganze Nukleotide modifiziert werden; es können außerdem Insertionen, Deletionen, Fehlpaarungen und DNA-Addukte auftreten [146, 147]. Darüber hinaus kann es zu einem Einzelstrangbruch (ESB) oder einem Doppelstrangbruch (DSB) kommen, wobei DSBs besonders mutagen und zytotoxisch sind [148, 149].

Die Aktivierung der DDR erfolgt über zwei große Signalwegen. Bei ESBs wird der ATR-CHK1 Weg aktiviert, wohingegen bei DSBs der ATM-CHK2 Weg eingeleitet wird (**Abb. 4**) [150-153]. Außer diesen beiden Signalwegen kann bei einem DSB auch die Kinase DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*) zur Schadensstelle rekrutiert werden. Dabei bildet das Enzym DNA-PKcs mit Ku70/Ku80 ein Komplex, welches als DNA-anhängige Kinase (DNA-PK) bezeichnet wird [154]. Sowohl ATM, als auch ATR oder DNA-PKcs sind Ser/Thr-Kinasen und werden der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K/PI4K)-Familie zugeordnet [155]. Die Aktivierung dieser Signalkaskaden kann entweder einen Zellzyklusarrest verursachen oder eine DNA-Reparatur einleiten [156]. Darüber hinaus kann die DDR zum Eintritt in die Seneszenz [157, 158] oder bei irreparablen Schäden zum Zelltod führen [149, 159].

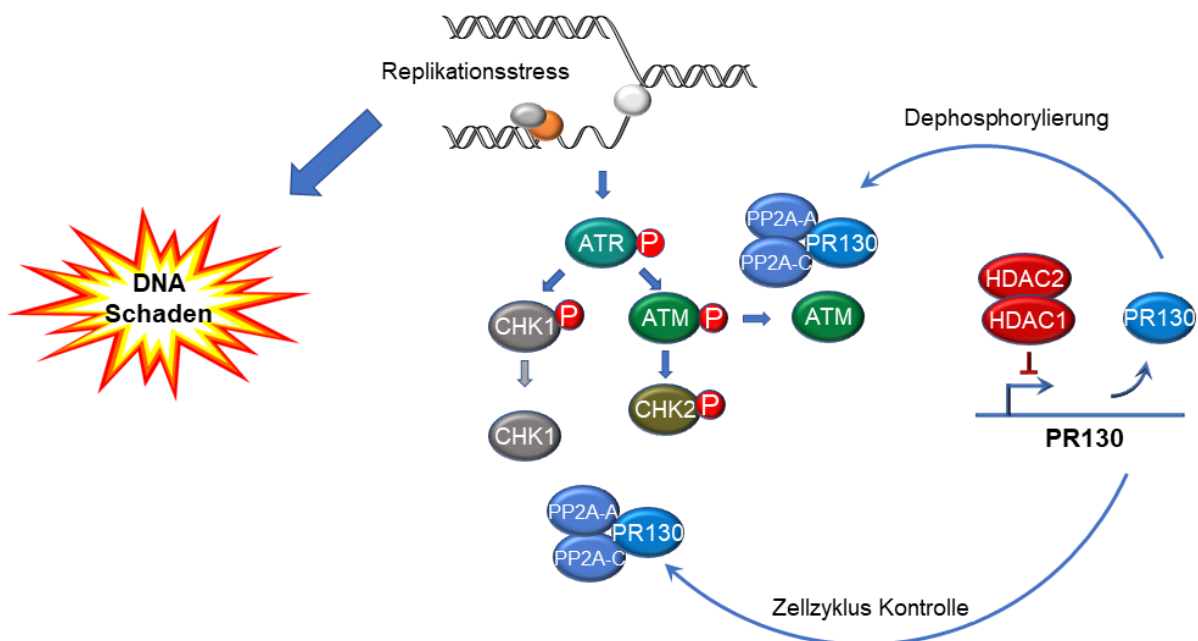


Abbildung 4: **Aktivierung der DNA-Schadensantwort in einer Zelle.** Durch die Detektion von Replikationsstress wird ATR aktiviert und phosphoryliert, was eine Phosphorylierung von ATM und CHK1 zur Folge hat. ATM phosphoryliert CHK2 und weitere nachgeschaltete Proteine wie p53 und p21. Die Aktivierung dieser Signalkaskade führt zu einem Stillstand des Zellzyklus und verschiedene Reparaturmechanismen werden aktiviert, um eine Replikation von geschädigter DNA zu verhindern. Sind die Schäden irreparabel, so wird die Apoptose eingeleitet. Die Expression von PR130 wird durch die Aktivität der HDACs reguliert. HDAC1/2 können an den PPP2R3A Promotor binden und die PR130 Expression unterdrücken. Der PP2A-PR130-Komplex kontrolliert den Zellzyklus und entscheidet über das Schicksal der Zellen. Der Komplex bindet direkt an p-ATM, was zur Dephosphorylierung von ATM führt. Außerdem wird die CHK1 Phosphorylierung über den PP2A-PR130-Komplex kontrolliert. Diese Abbildung wurde nach [86] modifiziert.

Bei einem DSB wird der MRN-Komplex (MRE11-RAD50-NBS1-Komplex) sofort an die offenen DNA-Enden rekrutiert [160-162]. ATM bindet an den MRN-Komplex und wird durch eine Autophosphorylierung an Ser1981 aktiviert. Im inaktiven Zustand liegt ATM als Dimer oder Heterodimer vor. Bei einer Aktivierung dissoziieren die Heterodimere zu Monomeren, welche eine Phosphorylierung und Aktivierung von CHK2 an Thr68 zur Folge hat [163, 164]. Ein weiteres Protein, welches zu den frühesten Zielproteinen von ATM zählt, ist das Histon H2AX [165]. Als direktes Zielprotein von ATM wird H2AX an Ser139 phosphoryliert und wird in diesem Zustand als γ -H2AX bezeichnet [166, 167]. Durch die Bindung von γ -H2AX wird die DNA stabilisiert und ermöglicht die Bindung von DNA-Reparaturfaktoren [168, 169]. γ -H2AX ist somit ein wichtiger Marker für DSBs und kann ebenfalls durch DNA-PKcs phosphoryliert werden.

Ein wichtiger Marker für die ESB stellt das *replication protein A* (RPA), welches mit einer sehr hohen Affinität an die Einzelstrang-DNA (*single strand DNA*, ssDNA) bindet [170]. Die ssDNA tritt vor allem in der S-Phase der Mitose auf. Die doppelsträngige DNA wird durch die *Minichromosome Maintenance* (MCM) Helicasen entspiralisiert. Falls in dieser Phase ein Nukleotidmangel vorliegt, entstehen dadurch die instabilen ssDNA [156, 159, 171, 172]. Durch die Bindung von RPA an die ssDNA wird das *ATR interacting protein* rekrutiert und gebunden [153, 162, 173]. Dadurch wird ATR an Thr1989 phosphoryliert und aktiviert. In Folge dessen erfolgt eine Phosphorylierung von CHK1 an Ser317 oder Ser345 [150].

Die Aktivierungen von ATM, ATR und DNA-PKcs können nicht unabhängig voneinander betrachtet werden, da diese drei Masterkinasen über 700 Proteine regulieren und es Überschneidungen bei deren Zielproteinen gibt [159, 174, 175]. ATR ist in der Lage ATM zu rekrutieren, wohingegen DNA-PKcs ATM inhibieren kann [176]. Wiederum kann ATM die Kinasen ATR und CHK1 phosphorylieren [175, 177]. Werden die Checkpoint-Kinasen phosphoryliert, kommt es zu einem Zellzyklusstopp, damit die beschädigte DNA nicht weitergegeben wird und sich keine Mutationen bilden können [156, 178].

1. Einleitung

Ein weiteres gemeinsames Zielprotein von ATM und ATR ist das Tumorsuppressorprotein p53. Dieses übernimmt eine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation, bei der Aktivierung von DNA-Reparaturwegen oder bei der Induktion des Zelltodes. Das Protein p53 kann sowohl von ATM als auch von ATR an Ser15 phosphoryliert und aktiviert werden [159, 179]. Im Ruhezustand wird p53 von den E3-Ligasen MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*) und MDM4 negativ reguliert, welche p53 kontinuierlich bei intakter DNA abbauen [180]. Durch die Phosphorylierung durch ATM oder ATR koppelt sich p53 ab, akkumuliert und entscheidet je nach Schwere des Schadens, ob ein Zellzyklusarrest oder die Apoptose (programmierter Zelltod) eingeleitet wird [179, 181].

Durch die Induktion von MGMT (*O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase*) oder MSH2 (*MutS homolog 2*) wird eine DNA Reparatur eingeleitet. Werden jedoch die proapoptischen Proteine der BCL-2 Familie wie NOXA, PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) oder BAX (*BCL-2-associated X protein*) durch p53 aktiviert, so kommt es zu einer Induktion der Apoptose [156, 159, 182-184]. Einen direkten Einfluss auf den Zellzyklus hat p53 durch Aktivierung seines direkten Zielproteins p21., welches das wichtigste und bekannteste Protein der CDK-Inhibitorprotein (CIP) Familie ist. Das Protein p21 unterdrückt am G1/S-Kontrollpunkt die CDK2/CyclinE-Aktivität, sodass es zu einem Zellzyklusstopp und einer Akkumulation in der G1-Phase kommt [185-187]. Durch die vielfältige Rolle von p53 wird dieses Protein auch als Wächter des Genoms bezeichnet [156, 184]. Es ist daher auch nicht verwunderlich, dass viele Krebsarten eine p53-Mutation aufweisen, wodurch die natürliche Kontrollfunktion von p53 eingeschränkt oder unterdrückt ist und die Zellen somit dem Zelltod entkommen können [188, 189].

1.3.2. DNA-Reparaturmechanismen

Irreparable ESBs und DSBs können die Apoptose in einer Zelle einleiten [190]. Tritt der Schaden in der S- oder G2- Phase auf, so wird dieser über die Homologe Rekombination (HR) repariert, da ein komplementäres Schwesterchromatid als Vorlage benötigt wird. RAD51 ist hierbei das Protein, das für Einleitung der HR essenziell ist. Bei einem ESB entstehen ssDNA, die unmittelbar nach der Entstehung von RPA umhüllt werden. Anschließend wird RPA durch RAD51 ersetzt, welches nach der komplementären Sequenz sucht und mit dieser interagiert, sodass die HR ablaufen kann [191, 192].

Ist der Schaden in der *Gap 0/Gap 1*-Phase (G0/G1), so wird der Mechanismus des *non-homologous DNA end joining* (NHEJ) für eine Reparatur aktiviert. DSBs werden abhängig von der Zellzyklusphase durch dieser beiden Mechanismen behoben, wobei die NHEJ schneller, aber dafür fehleranfälliger ist als die HR [160, 161]. NHEJ startet mit der Erkennung des DSBs durch das Dimer Ku70/Ku80, welches direkt an die Bruchstelle bindet und DNA-PKcs rekrutiert. Anschließend bilden die Ligase IV und der *X-Ray Repair Cross Complementing 4* einen Komplex und verbinden die Enden des DSB miteinander. Auftretende Mutationen werden bei diesem Schritt in den reparierten DNA-Strang eingebaut [193].

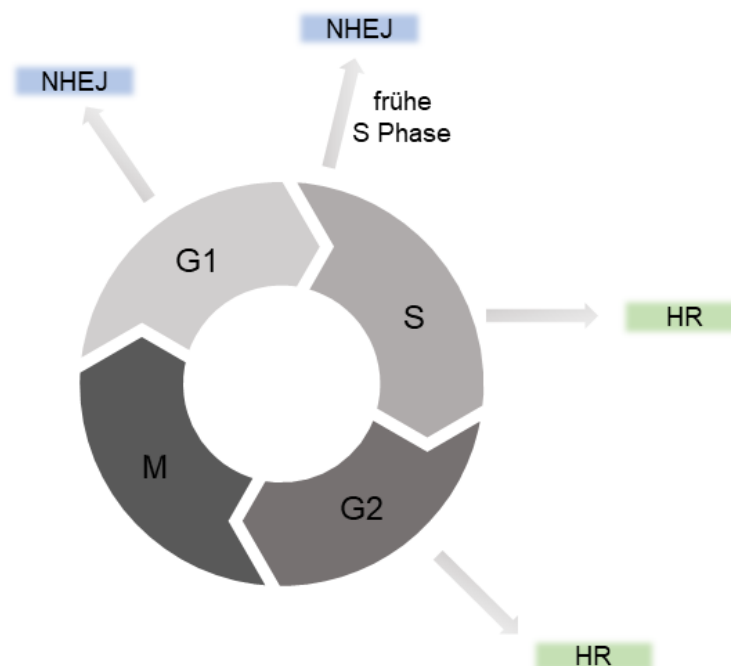


Abbildung 5: Die DNA-Reparaturmechanismen sind zellzyklusabhängig. In der G1- und der frühen S-Phase wird bei einem DNA Strangbruch die NHEJ aktiviert. In der G2 und der S-Phase wird die HR zur Reparatur von Strangbrüchen an der DNA aktiviert. Die Abbildung wurde mit Hilfe von den Quellen [160, 161, 191, 192] selbst erstellt.

1.3.3. Hydroxyurea (HU)

Das Zytostatikum Hydroxyurea (HU) ist ein Inhibitor der Ribonukleotid-Reduktase (RNR), welches die Umwandlung von Ribonukleotidtriphosphat (rNTP) in 2'-Desoxyribonukleotidtriphosphat (dNTP), katalysiert [194]. Damit ist die RNR direkt an der DNA-Synthese beteiligt (**Abb. 6A**). Die Wirkung von HU zeigt sich in der S-Phase, indem es Replikationsstress (RS) induziert und einen S-Phase-Arrest herbeiführt. Die Hemmung der RNR durch HU ist reversibel, eine hohe Dosis oder eine längere Behandlungszeit kann jedoch den Zelltod herbeiführen [195]. HU wird als Kapsel oral eingenommen und wird heutzutage als Zytostatikum erfolgreich bei CML [196, 197] oder zur Therapie einer Sichelanämie [198] eingesetzt. Neueste Studien zeigten auch eine Wirksamkeit bei der Behandlung von Alzheimer [195] und als Folgetherapie nach einer Resektion von Hals- und Nackenkarzinomen [199].

RNR besteht aus den zwei homodimeren Untereinheiten *ribonucleotide reductase regulatory subunit M1* (RRM1) und *ribonucleotide reductase regulatory subunit M2* (RRM2), wobei RRM2 die kleinere Untereinheit ist (**Abb. 6B**). Diese Untereinheit weist einen stabilen Di-Eisen-Tyrosyl-Radikal-Cofaktor auf, während RRM1 sich durch eine katalytische und zwei allosterische Regulationsstellen auszeichnet [200-202]. Durch einen Radikaltransfer wird die Umwandlung von Ribonukleotiden in 2'-Desoxyribonukleotide katalysiert. Eine Behandlung mit HU löst eine Reduktion des Radikalzentrums von RRM2 aus, wobei HU als Radikalfänger dient und das entstandene Radikal komplexiert [203]. Basierend auf diesem Mechanismus wird die RNR durch HU inhibiert, was wegen der erhöhten Teilungsrate von Krebszellen und dem damit verbundenen höheren Verbrauch an dNTPs vorteilhaft ist. Durch HU kann dieser hohe Bedarf nicht mehr gedeckt werden, so dass es zum RS kommt. Die Replikationsgabeln werden angehalten und die Zellen arretieren in der S-Phase. Dadurch entstehen ESBs und DSBs, welche die Zelle durch die Reparaturmechanismen NHEJ oder HR zu reparieren versucht. Gelingt dies nicht, so wird in den betroffenen Zellen Apoptose induziert [171].

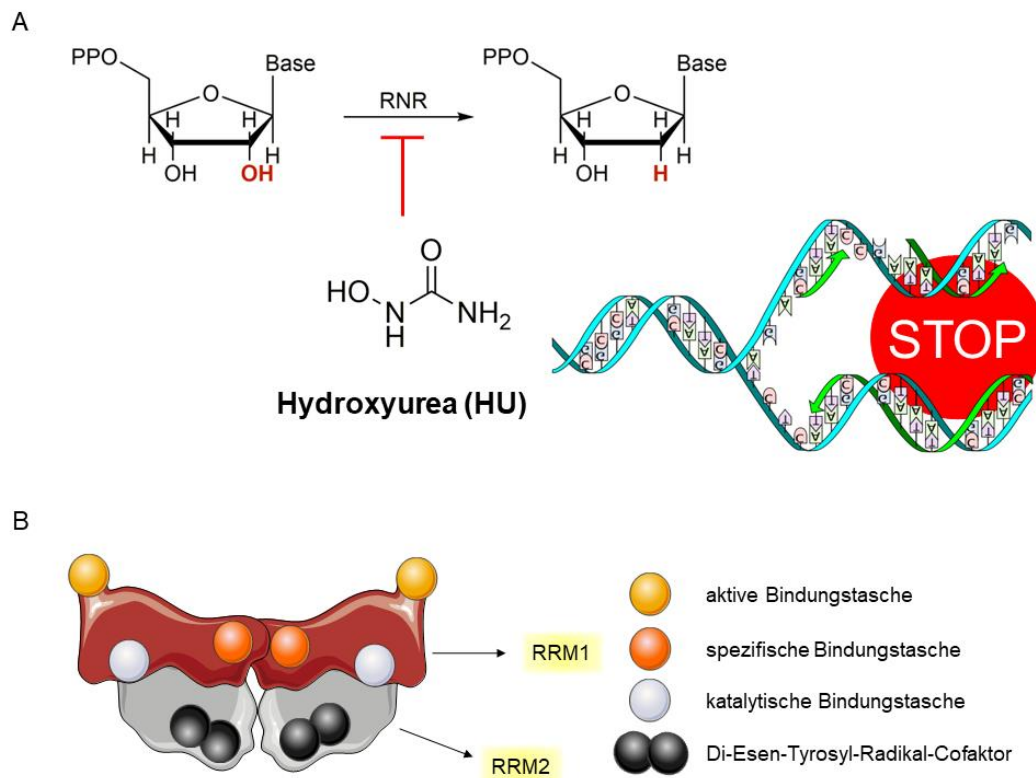


Abbildung 6: **Die Aktivität der Ribonucleotidreduktase wird durch Hydroxyurea inhibiert.** (A) Durch HU kommt es in behandelten Zellen zu einem Zellzyklusstopp in der S-Phase. (B) Die RNR besteht aus den Untereinheiten RRM1 und RRM2, wobei das Di-Eisen-Tyrosyl-Radikal sich in der kleineren Untereinheit RRM2 befindet. Die Abbildung wurde mit den Informationen aus den Quellen [194, 202] erstellt.

1.3.4. COH29 als RNRi

Im Laufe dieser Arbeit wurde ein weiterer RNR-Inhibitor getestet. Es handelt sich hierbei um COH29 [204]. Dieser befindet sich derzeit in der präklinischen Entwicklung [204, 205]. COH29 ist eine Thiazolverbindung, die eine hoch konservierte Ligandtasche zwischen der RRM1- und RRM2-Untereinheit besetzt und somit die Funktion der RNR inhibiert. Es wurde bereits nachgewiesen, dass die Wirkung von COH29 *in vitro* bei Konzentrationen von weniger als 10 μM eintreten. Auch hier verursacht die Inhibierung von RNR durch COH29 RS, wodurch die Zellen in der S-Phase arretieren und einen Zelltod zur Folge hat. Aufgrund der Tatsache, dass COH29 kein Eisenchelator ist, wird darauf spekuliert, dass mögliche Nebenwirkungen bei der Behandlung reduziert werden können [204].

1.3.5. Irinotecan (IT)

Irinotecan ist ein Inhibitor der Topoisomerase-1 (TOP-1) [206] und wird unter dem Handelsnamen Campto® [207] oder Camptosar® [208] bei PatientInnen mit Darmkrebs und Pankreaskarzinomen im FOLFOXIRI oder FOLFIRINOX Schema verabreicht [209]. Die Funktion der TOP-1 ist die Entspiralisierung bzw. die Entspannung der DNA-Doppelhelix bei der DNA-Replikation und -Transkription. Dabei werden ESBs erzeugt, die im Normalfall durch TOP-1 stabilisiert werden [210]. Wird die TOP-1 gehemmt, so können DNA-Strangbrüche nicht wieder verschlossen werden, die Replikationsgabel wird blockiert und es kommt zum Abbruch der Replikation [211]. Da die TOP-1 ein replikationsspezifisches Enzym ist, zeigt sich die Wirkung von IT spezifisch in der S-Phase [206]. IT wird in der Leber durch die Carboxylesterase-I und -II in seine aktive Form SN-38 metabolisiert (**Abb. 7**) [212].

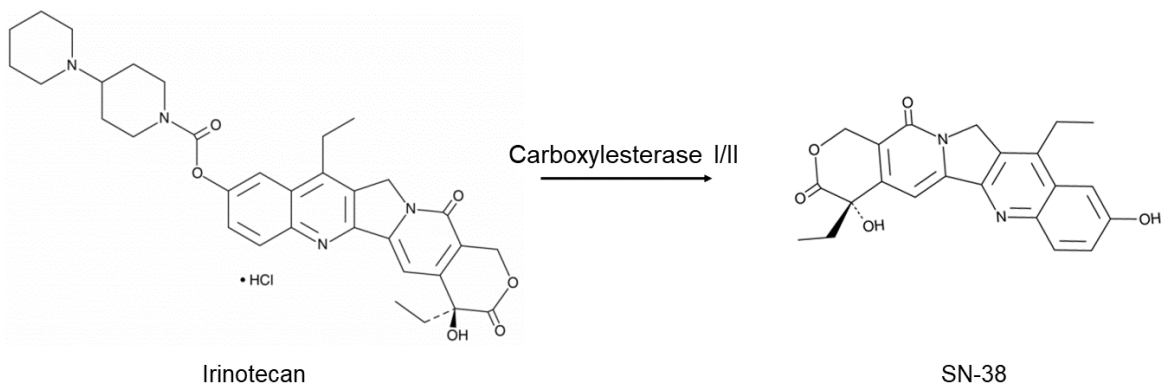


Abbildung 7: **Strukturformel von IT und seiner aktiven Form SN-38.** Erstellt nach den Angaben von [212, 213].

Neueste Studien zeigen, dass IT nicht spezifisch die TOP-1 inhibiert. Die aktive Form SN-38 interagiert mit der E3-Ligase MDM2, welches zusammen mit MDM4 das Tumorsuppressorprotein p53 negativ reguliert (**s. Kapitel 1.3.1**) [180]. Darüber hinaus kann IT auch die Expression des anti-apoptotischen Proteins BCL-X_L unterdrücken [214]. Durch die Interaktion mit MDM2 und BCL-X_L kann IT die p53-abhängige Apoptose induzieren [215], was die Effizienz dieser Substanz gegenüber Krebszellen erhöht.

1.3.6. Phendion (1,10 - Phenanthrolin - 5,6 - dion, PD)

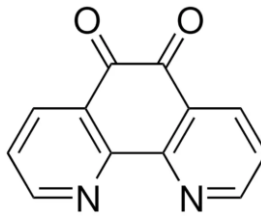


Abbildung 8: Chemische Strukturformel des PP2 Inhibitors PD.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Funktionen von PP2A pharmakologisch untersucht. Dafür wurde der neuartige niedermolekulare (*small molecule*) PP2A Inhibitor (PP2Ai) Phendion (PD) verwendet, der gezielt und selektiv die Aktivität von PP2A inhibiert, ohne dabei andere Proteinphosphatasen wie PP1-C α oder PP1-C β zu beeinflussen (**Abb. 8**). Die Wirkung von PD wurde in Melanomzellen untersucht und zeigte in diesen Zellen vielversprechende Ergebnisse [216]. Dabei wurde PD direkt mit einem weiteren potenten PP2Ai verglichen, welches sich bereits in der Phase I der klinischen Forschung befindet [85]. Es handelt sich hierbei um die gut erforschte Substanz LB100 [217, 218], für welche in neueren Studien auch eine Inhibierung der katalytischen Untereinheit PPP5C gefunden wurde [219]. Die Behandlung mit PD oder LB100 aktivieren die DDR. Der IC₅₀ Wert von LB100 in A-375 Zellen beläuft sich auf 4.9 μ M. Im Gegensatz dazu wurde für PD in derselben Zelllinie ein IC₅₀ Wert von 0.1 μ M festgestellt. Somit zeigte PD im direkten Vergleich eine höhere Effizienz. Darüber hinaus ist PD in der Lage, eine Akkumulation von DNA-Schadensmarkern zu induzieren, die nicht mit DNA-Strangbrüchen einhergehen [216].

In der Krebsforschung werden neben LB100 weitere PP2Ai verwendet, wie Cantharidin [220] oder Okadasäure [221], wobei beide keine selektive Hemmwirkung auf PP2A besitzen. Okadasäure hemmt ebenfalls PP1 [221], während Cantharidin sowohl PP1 als auch PP5 inhibiert [222].

Da die Wirkung von PD noch unerforscht ist, ist es von besonderem Interesse, ob die Anwendung dieses Inhibitors auch für eine gezielte Therapie in anderen Krebsarten geeignet wäre. Im Rahmen dieser Dissertation wird seine Wirkung in Pankreaskarzinomzellen und in Leukämiezellen charakterisiert und diskutiert.

1.4. Zellzyklus: Regulation und Kontrollpunkte

Der Zellzyklus beschreibt einen sich immer wieder wiederholenden Ablauf in der Zelle und kann in die Interphase und die Mitosephase (M-Phase) unterteilt werden. In der Interphase finden Prozesse, wie Zellwachstum und Zellstoffwechsel statt. In der Mitosephase findet die Zell- und Kernteilung statt [223]. Eine Zykluslänge beträgt je nach Zelltyp zwischen 18.5 – 27 h [224, 225].

Sowohl die Interphase als auch die M-Phase können in weitere Phasen unterteilt werden. In der Interphase wird zwischen der G1-, S-, und der G2-Phase unterschieden, während die Mitose sich in Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase eingliedern lässt [226, 227].

Die G1-Phase kommt direkt im Anschluss nach der Beendigung der Mitose. In dieser Phase ist der Energieverbrauch besonders hoch, da die Zelle auf die S-Phase vorbereitet wird, welche sich der G1-Phase direkt anschließt. Für die S-Phase werden Mikrotubuli, Replikationsenzyme, Proteine, Histone und mRNA (*messenger RNA*) synthetisiert. Darüber hinaus ist diese Phase durch das Zellwachstum geprägt, welches zusätzlich zum hohen Energieverbrauch beiträgt [228]. Der G1/S-Übergang wird strengstens durch Cycline und ihre CDKs überwacht. An diesem Restriktionspunkt wird entschieden, ob die Zelle in die S-Phase eintreten kann oder auf Grund von Nährstoffmangel, kritischer Zellgröße oder fehlerhafter DNA in der G0-Phase arretiert [229].

Cycline und CDKs regulieren den Zellzyklus, in dem sie einen Komplex bilden und somit den Übergang in die nächste Phase freigeben [226, 230]. CDKs können von Mitgliedern der CIP-Familie gehemmt werden. Darüber hinaus können CDKs auch phosphoryliert und dephosphoryliert werden [231], welches ein zusätzlicher Kontrollmechanismus darstellt. Das wichtigste und bekannteste Protein der CIP-Familie ist p21, welches durch p53 direkt reguliert wird (s. **Kapitel 1.3.1.**).

Da in der S-Phase die DNA-Replikation stattfindet, besteht bei Beendigung dieser Phase jedes Chromosom aus zwei Chromatiden [227, 232]. In der G2-Phase wächst die Zelle und nimmt ihre finale Größe an, um sich für anstehende Zellteilung in der M-Phase vorzubereiten. In dieser Phase findet ebenfalls die Proteinbiosynthese statt [233].

Wie der G1/S-Restriktionspunkt, wird auch der Übergang von der G2-Phase in die Mitose strengstens durch die Aktivität der CDKs und der Cycline überwacht. CDK1 (oder auch *cell division cycle 2*, CDC2) und Cyclin B bilden in der G2-Phase den *mitosis-promoting factor* (MPF), welcher für den Übergang in die Mitose essenziell ist. Dieser Komplex wird durch WEE1 negativ kontrolliert, indem WEE1 eine inhibierende Phosphatgruppe auf CDK1 an Tyr15 überträgt [234, 235]. Diese Phosphatgruppe kann nur durch CDC25c entfernt werden, was zu einer Aktivierung des MPFs führt und den Eintritt in die Mitose zur Folge hat [236]. CDC25c ist in der Interphase inaktiv, was sich durch eine inhibierende Phosphatgruppe an Ser216 und die Bindung des Proteins 14-3-3 auszeichnet [237]. Diese inhibierende Phosphatgruppe kann in der Interphase von CHK1 oder CHK2 übertragen werden. Der CDC25c/14-3-3 Komplex befindet sich im Ruhezustand im Zytoplasma und wird erst bei Bedarf in den Nukleus rekrutiert, um MPF zu dephosphorylieren und die Mitose somit einzuleiten (**Abb. 9**) [238-240].

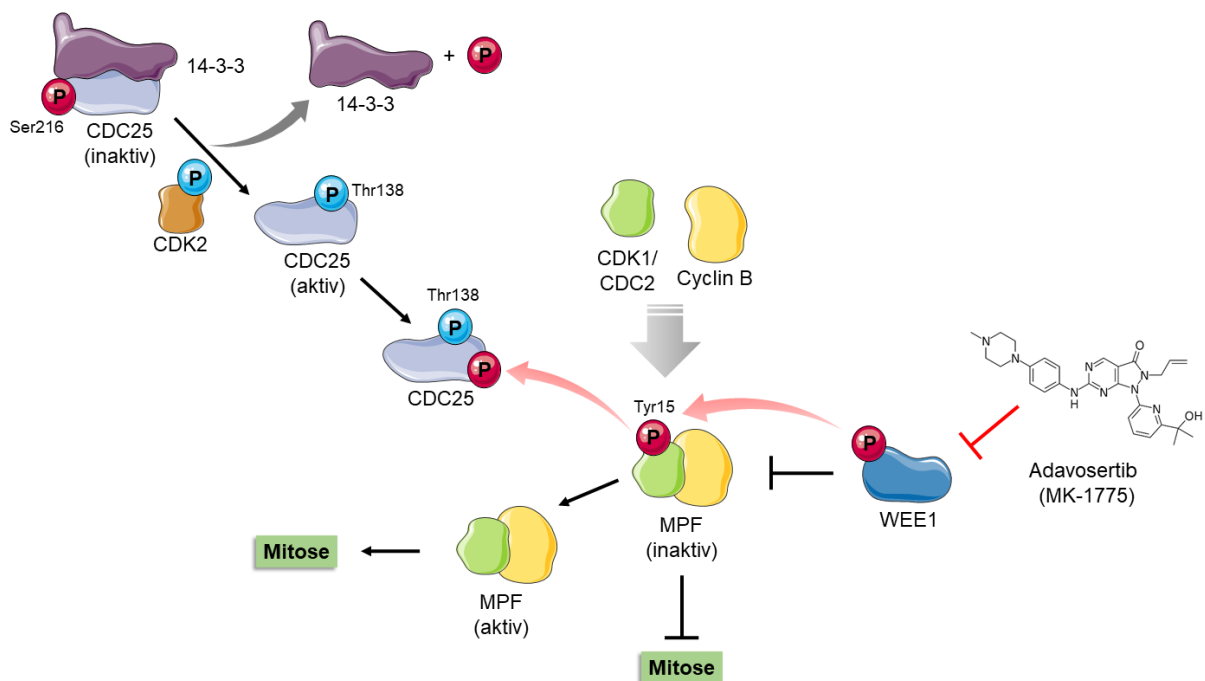


Abbildung 9: **Der G2/M Kontrollpunkt im Zellzyklus.** In der Interphase ist CDC25 inaktiv, welches durch die Bindung des Proteins 14-3-3 und einer Phosphatgruppe an Ser216 gekennzeichnet ist. In der Interphase können sowohl CHK1 als auch CHK2 das CDC25 an Ser216 phosphorylieren. Um CDC25 am G2/M Übergangspunkt zu aktivieren, wird CDC25 von CDK2 an Thr138 phosphoryliert, wodurch 14-3-3 freigesetzt wird. Nun ist CDC25 aktiv und kann die inhibierende Phosphatgruppe von CDK1 auf sich nehmen, um den MPF Komplex zu aktivieren. Die inhibierende Phosphatgruppe am MPF Komplex wurde zuvor durch WEE1 übertragen, um den Eintritt in die Mitose bei Schäden in der DNA zu stoppen. MK-1775 inhibiert die WEE1-Aktivität, wodurch der MPF Komplex nicht negativ reguliert werden kann. Eine Mitose kann nicht gestoppt werden und die Zellen enden in einer tödlichen mitotischen Katastrophe. Diese Abbildung wurde mit den Informationen aus den Quellen [234-237] selbst erstellt.

1. Einleitung

Das Protein CDC25 ist ebenfalls ein direktes Zielprotein der PLK1, wobei PLK1 eine Doppelrolle in der Zellzyklusregulation übernimmt [241-244]. Einerseits wird CDC25 von PLK1 an Ser198 phosphoryliert, wodurch der Import von CDC25c in den Nukleus induziert wird [245, 246]. Andererseits kann WEE1 durch PLK1 phosphoryliert werden, was zum Abbau der WEE1-Kinase führt [247]. Beide Vorgänge dienen dazu, die Zellen in die Mitose zu bringen (**Abb. 10**) [248]. Darüber hinaus markiert PLK1 das Ende einer Mitosephase durch die Phosphorylierung von Zentromerproteinen [249] und dem APC-Komplex (*anaphase promoting complex*) [250]. APC ist eine E3-Ubiquitin-Ligase und ist für den Abbau mitotischer Cycline und CDKs verantwortlich [251]. Wird der APC-Komplex durch PLK1 aktiviert, so kommt es zum Abbau von Cyclin A, Cyclin B und CDK1, wodurch die Mitose beendet wird [252]. PLK1 selbst wird von dem Protein Aurora phosphoryliert und aktiviert [241-244].

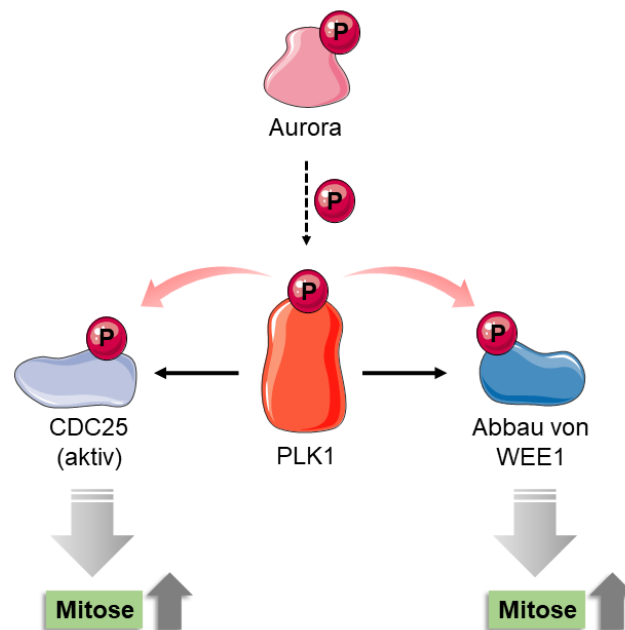


Abbildung 10: **Die Aufgaben der Ser/Thr-Kinase PLK1 am G2/M Kontrollpunkt.** PLK1 phosphoryliert CDC25 an Ser198 und aktiviert somit die Translokation dieses Proteins in den Nukleus. Dort dephosphoryliert CDC25 den MPF Komplex, um die Mitose anzutreiben. PLK1 kann ebenfalls WEE1 phosphorylieren, wodurch der Abbau dieses Proteins aktiviert wird. Dadurch kann der MPF Komplex nicht mehr negativ kontrolliert werden und die Mitose wird ebenfalls über diesen Mechanismus angetrieben. Diese Abbildung wurde aus den Informationen mit den Quellen [241-247] selbst erstellt.

In der Mitose findet die Zellteilung statt. Die erste Phase der Mitose ist die Prophase. Hier kondensieren die Chromosomen der Mutterzelle und erscheinen X-förmig, wobei die zwei Schwesterchromatiden am Zentromer zusammengehalten werden. Die Bildung des Spindelapparats, verbunden mit der Ausbildung der Mikrotubulis, findet ebenfalls in dieser Phase statt.

Die Grundstruktur der Mikrotubulis besteht dabei aus α/β -Tubulin-Heterodimeren, die sich Kopf-an-Schwanz verbinden und somit einen hohlen Faden ausbilden [253]. Die Zentrosome fangen an sich auf gegenüberliegende Polen zu platzieren. Die Metaphase beginnt mit einer Auflösung der Zellmembran, gefolgt von einer finalen Anordnung der Chromosomen entlang des Zelläquators. In der Anaphase werden die Schwesterchromatiden durch die Mikrotubulis getrennt, wobei jedes Schwesterchromatid zu den jeweiligen Zellpolen gezogen wird. Auch in der Mitose gibt es einen Kontrollpunkt, welcher als Metaphase-Kontrollpunkt bezeichnet wird und zur korrekten Ausführung der Mitose dient. Erst wenn alle Spindelfasern des Spindelapparats mit dem Kinetochor verbunden sind und die Chromosomen sich in der Äquatorialebene angeordnet haben, findet die Trennung der Chromatiden in der Anaphase statt [254-258]. In der Telophase wird der Spindelapparat mit den Mikrotubulis abgebaut, wobei gleichzeitig eine neue Zellmembran um die jeweiligen Chromosomen ausgebildet wird. Nach dieser Phase ist die Mitose beendet und es liegen zwei Tochterzellen vor.

Der Zellzyklus ist in Eukaryoten höchst komplex und findet stark konserviert statt, wobei jeder Schritt fehlerfrei ablaufen muss [259]. In verschiedenen Krebsarten konnte eine Fehlregulierung im Zellzyklus nachgewiesen werden. Durch eine Deregulation oder Hyperphosphorylierung von essenziellen Proteinen werden Kontrollpunkte übergangen, wodurch fehlerbehaftete Zellen können im Zellzyklus weiter voranschreiten und sich unkontrolliert vermehren [260, 261].

1.4.1. Adavosertib (MK-1775)

MK-1775 (Handelsname Adavosertib) befindet sich derzeit in Phase II der klinischen Studien [262]. Es handelt sich hierbei um einen potenten und selektiven ATP-kompetitiven Inhibitor der WEE1-Kinase [263].

Wie bereits in **Kapitel 1.4.** erläutert, übernimmt die Kinase WEE1 eine wichtige Rolle am G2/M-Kontrollpunkt, in dem es den CDK1/CyclinB phosphoryliert und den MPF-Komplex somit negativ reguliert. Die Mitose kann in diesem Zustand nicht initiiert werden und es kommt zu einem G2-Arrest. Durch eine pharmakologische Inhibierung von WEE1 wird die Mitose frühzeitig eingeleitet, wodurch Zellen mit nicht reparierten Schäden an der DNA in die Mitose eintreten [264].

In diesem Fall wird die mitotische Katastrophe eingeleitet, welche tödlich für die betroffenen Zellen endet (s. **Kapitel 1.5.4.**). Durch die zytotoxische Wirkung einer WEE1-Inhibierung, hat der Angriff auf diese Proteinkinase sich als ein vielversprechender therapeutischer Angriffspunkt entpuppt [265].

Es wurde gezeigt, dass eine Überexprimierung von WEE1 in Leukämie, Melanomen [266], Glioblastomen, Brustkrebs [267, 268] oder Darmkrebs [269] mit schlechteren Überlebenschancen der PatientInnen korrelierte [267, 268]. Eine Reduktion der WEE1 Proteinaktivität durch eine siRNA oder einen spezifischen Inhibitor reduzierte die Tumorlast und war daher mit besseren Überlebenschancen verbunden. Adavosertib wird meistens in Kombination mit anderen Chemotherapeutika verabreicht [270]. Dabei wird die Dosis an MK-1775 geringgehalten, da diese Substanz zu Übelkeit, Erbrechen und Müdigkeit führt [271].

In der Literatur kann die Wirkung von MK-1775 in PDAC weitestgehend noch nicht klar charakterisiert werden. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass in von Patienten stammenden Xenotransplantaten von Pankreaskarzinomen (*patient-derived pancreatic cancer xenografts*) MK-1775 zusammen mit Gemcitabin bessere Ergebnisse erzielten als in den jeweiligen Einzelbehandlungen. Dabei wurden p53-defiziente und p53-profiziente Xenografts verglichen, wobei nur p53-defiziente Xenografts eine Rückbildung des Tumors zeigten [272].

Die kritische Funktion von WEE1 unterstreicht seine Potenz als geeigneter therapeutischer Ansatzpunkt. Es ist daher von entscheidender Bedeutung, die Wirkungsweise und die zellulären Mechanismen von MK-1775 in den besonders schwer zu behandelnden PDAC zu untersuchen.

1.5. Zelltodmechanismen

In einem gesunden Organismus stehen die Neubildung bzw. Proliferation von Zellen mit dem Zelltod im Gleichgewicht. Wird das Gleichgewicht gestört, beispielsweise durch Ausschaltung der Zelltodinduktion, kommt es zur unkontrollierten Zellteilung und Entstehung von Krebszellen. Bis heute sind mehrere Zelltodmechanismen charakterisiert. Einige von ihnen werden im folgenden Kapitel näher erläutert.

1.5.1. Apoptose

Die Apoptose ist einer der am längsten erforschten und besten beschriebenen Zelltodmechanismen. Es handelt sich hierbei um einen natürlichen Vorgang, bei dem die Entsorgung von Zellen kontrolliert stattfindet. Die Apoptose wird eingeleitet, wenn Zellen irreparablen Schäden tragen (**s. Kapitel 1.3.**) oder ihre Funktion erfüllt haben und zu alt geworden sind [273]. Darüber hinaus ist die Apoptose ebenfalls involviert in der Embryonalentwicklung, in der Entwicklung des Immunsystems und bei der Differenzierung von Organen [274]. Die Apoptose dient demnach zum Selbstschutz des gesamten Organismus.

Bei der Apoptose kommt es zu morphologischen Veränderungen der Zellen. Da die Apoptose gezielt abläuft kann dieser Vorgang in einzelnen Zellen ablaufen, ohne das umliegende Gewebe zu schädigen. Die betroffene Zelle fängt an zu schrumpfen, rundet sich ab und löst sich von ihren Nachbarzellen. Im nächsten Schritt kondensieren die Chromosomen und die DNA wird über Endonukleasen fragmentiert. Das gesamte Zellmaterial, wie Zellmembran oder Organellen, werden in Membranvesikeln (*apoptotic bodies*) verpackt. Diese werden von Makrophagen durch Phagozytose entsorgt, ohne dabei eine Entzündungsreaktion im Gewebe auszulösen (**Abb. 12**) [275].

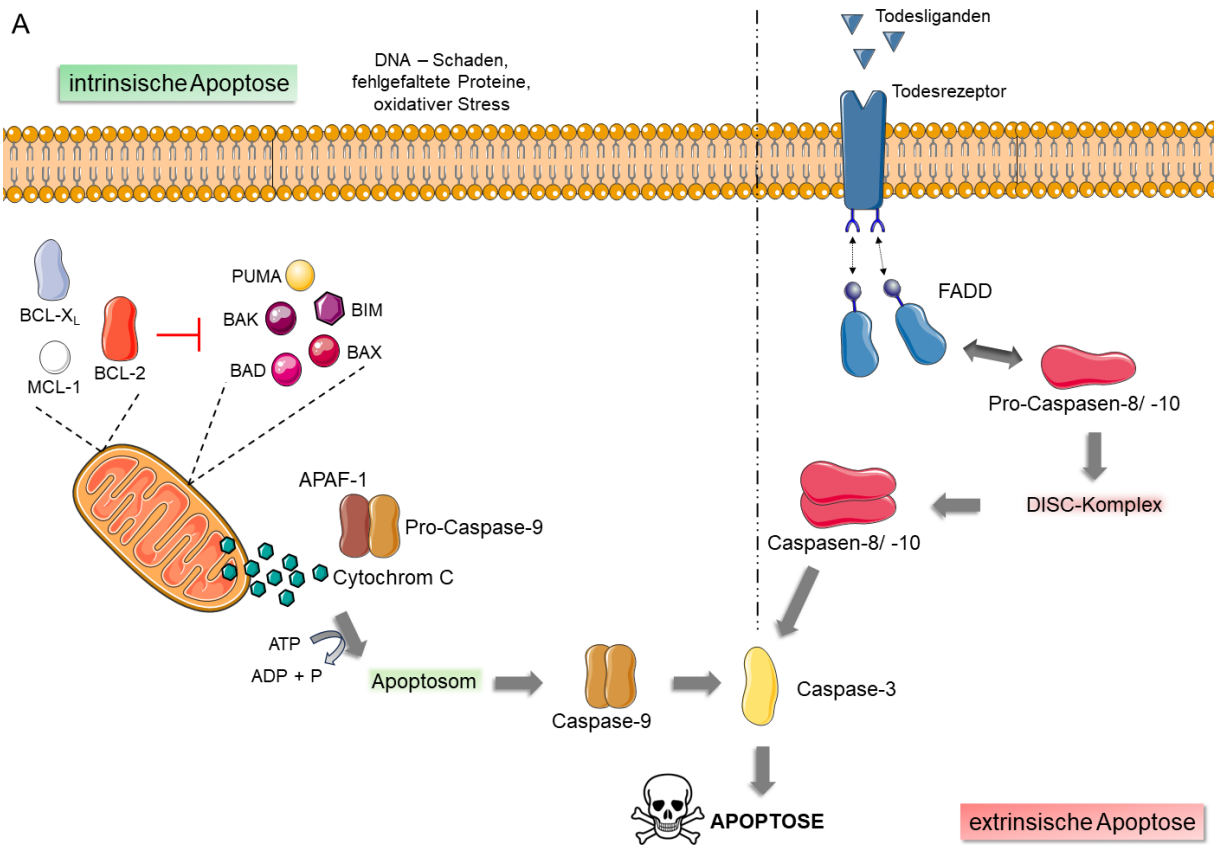
Die Apoptose kann extrinsisch oder intrinsisch ablaufen, wobei die extrinsische Apoptose Liganden-vermittelt, während die intrinsische Apoptose über das Mitochondrium abläuft. In beiden Fällen kommt es zur Aktivierung der Initiatorcaspasen, welche wiederum die Effektorcaspasen aktivieren und somit die Apoptose einleiten (**Abb. 11A**) [275].

Im Immunsystem dominiert die extrinsische Apoptose, da dieser Apoptoseweg durch äußere Einflüsse, wie bei einer Virusinfektion oder Toxineinwirkung, initiiert wird. Hierbei werden die Todesrezeptoren, wie FAS oder TNF (Tumornekrosefaktor), an die Zellmembran durch das intrazelluläre Adaptorprotein FADD (*Fas-associated protein with death domain*) rekrutiert [276]. Es bildet sich der DISC-Komplex (*death inducing signaling complex*), welche die Initiatorcaspasen -8 und -10 aktiviert. Diese wiederum aktivieren die Procaspase -3, wodurch der Zelltod ausgelöst wird.

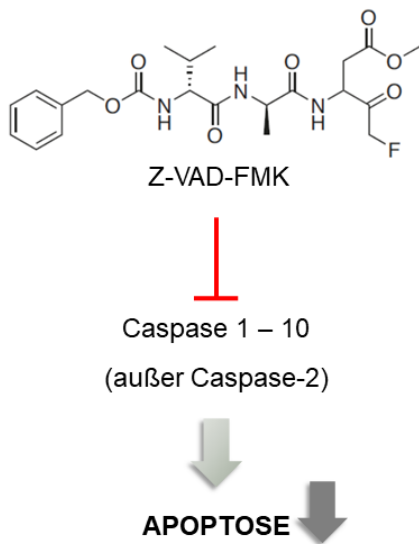
Die intrinsische Apoptose wird im Gegensatz zur extrinsischen Apoptose durch DNA-Schäden, fehlgefaltete Proteine oder oxidativen Stress ausgelöst. Es werden bei der intrinsischen Apoptose keine Liganden benötigt, da dieser Signalweg auf der Expression der *B-cell lymphoma 2* (BCL-2) Proteinfamilie beruht [277]. Diese Proteine sind an der Membran des Mitochondriums lokalisiert. Die Proteine der BCL-2 Familie unterscheiden sich in ihrer anti- oder pro-apoptotischen Funktion. Zu den anti-apoptotischen Proteinen gehören BCL-2, BCL-X_L oder MCL-1 (*myeloid cell leukemia-1*). Zu den pro-apoptotischen Proteine gehören BAX, BAK (*BCL-2-antagonist/killer*), BAD (*BCL-2-antagonist of cell death*), BIM (*B-cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death*) oder PUMA und NOXA [278]. PUMA wird von p53 direkt reguliert (s. **Kapitel 1.3.1.**).

Die anti-apoptotischen Proteine stabilisieren die Mitochondrienmembran, während die pro-apoptotischen Proteine Poren in der Membran verursachen, welche zu einer Veränderung der Permeabilität (*mitochondrial outer membrane permeabilisation*, MOMP) führt und in einem totalen Zusammenbruch enden. Dabei wird Cytochrom C freigesetzt, welches mit APAF-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) und der Procaspase-9 interagiert und unter ATP-Verbrauch das Apoptosom bildet. Die Bildung des Apoptosoms ist die Voraussetzung für eine Aktivierung von Caspase-9, welche nun weitere Effektorcaspasen aktivieren kann. Dazu gehört ebenfalls Caspase-3, welche über CAD (*caspase-activated DNase*) die DNA-Fragmentierung einleitet [279, 280].

Die Familie der IAPs (*inhibitors of apoptosis*) kann hierbei die Induktion der Apoptose inhibieren. Die Resistenz mancher Krebsarten gegen Chemotherapeutika ist durch eine Überexprimierung von cIAP-1 oder cIAP-2, XIAP oder Proteinen der BCL-2 Familie geprägt [281]. IAPs können direkt durch DIABLO oder HTRA inhibiert werden, welche ebenfalls mit Cytochrom C bei einem totalen Zusammenbruch der Mitochondrienmembran, freigesetzt werden.



B



C

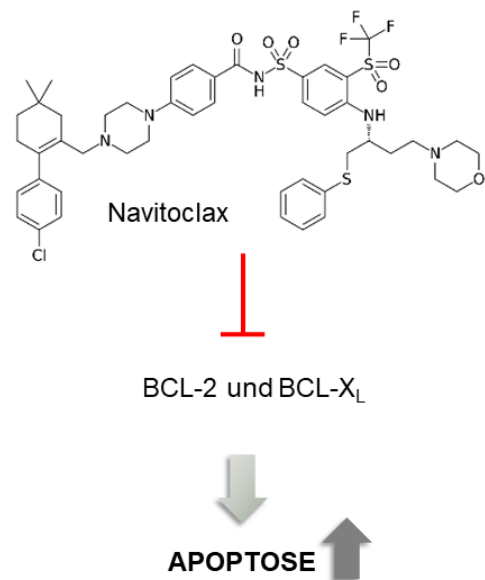


Abbildung 11: Die Apoptose kann extrinsisch oder intrinsisch induziert werden. (A) Die intrinsische Apoptose wird im Gegensatz zur extrinsischen Apoptose durch DNA-Schäden, fehlgefaltete Proteine oder oxidativen Stress ausgelöst. Es kommt unter ATP-Verbrauch zur Bildung des Apoptosoms, wodurch die Effektorcaspase-3 gespalten und Apoptose eingeleitet wird. Bei der extrinsischen Apoptose wird der DISC Komplex aktiviert, wodurch die Caspase-8 und -10 aktiviert werden. Es kommt auch hier zu einer Aktivierung der Caspase-3; die Apoptose wird ebenfalls eingeleitet. (B) Der Wirkstoff Z-VAD-FMK inhibiert die Caspase-Aktivität, wodurch Apoptose gezielt umgangen werden kann. (C) Der Wirkstoff Navitoclax inhibiert die anti-apoptotischen Proteine BCL-X_L und BCL-2. Dadurch kann Apoptose gezielt ausgelöst werden. Diese Abbildung wurde aus den Informationen aus den Quellen [275-280] selbst erstellt.

In der Krebsforschung ist es meistens von Interesse genau zu unterscheiden, ob der eintretende Zelltod durch Apoptose induziert wurde. Um dies zu untersuchen, können Substanzen wie Z-VAD-FMK oder Navitoclax (ABT-263) verwendet werden. Z-VAD-FMK hemmt in humanen Zellen die Caspasen 1-10 (mit Ausnahme der Caspase-2) [282-284]. In murinen Zellen werden die Caspasen -1, -3 und -11 durch Z-VAD-FMK inhibiert [282]. Durch die Verabreichung von Z-VAD-FMK bindet dieses irreversibel an die katalytischen Bindestellen der Caspasen [284]. Sind die Caspasen gehemmt, so kann die Apoptose nicht induziert werden und die Zellen zeigen eine erhöhte Überlebensrate (**Abb. 11B**) [283-286].

Navitoclax ist ein Inhibitor der anti-apoptotischen Proteine BCL-2 und BCL-X_L und die Behandlung mit diesem Inhibitor kann gezielt Apoptose in den behandelten Zellen auslösen (**Abb. 11C**) [287-289]. Dabei greift der Wirkstoff Navitoclax vor allem Zellen an, in denen die intrinsische Apoptose aktiviert wurden. Dieser Vorgang ist bei der Behandlung von seneszenten Zellen besonders von Bedeutung [288]. Derzeit befindet sich Navitoclax in der Phase II der klinischen Studien und wird oral, entweder in einer Monotherapie [290] oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika, verabreicht [291, 292]. Navitoclax wird in einer Kombinationstherapie erfolgreich gegen CLL (*chronic lymphocytic leukemia*) [293], ALL (*acute lymphoblastic leukemia*) [294], AML (*acute myeloid leukemia*) [295] und in soliden Tumoren, wie Melanomen [296] und PDAC [297] eingesetzt.

1.5.2. Nekrose

Die Nekrose ist eine Art des Zelltods, die im Gegensatz zur Apoptose unkontrolliert abläuft und durch verschiedene äußere Einflüsse induziert werden kann. So kann eine Nekrose durch extreme Temperaturen, hohe Strahlenbelastung, chemische Gifte oder durch Befall von Viren und Bakterien ausgelöst werden [298]. Das Eintreten einer Nekrose ist meistens mit einer Entzündungsreaktion verbunden. Anders als bei der Apoptose verläuft die Nekrose unabhängig von Caspasen [299, 300]. Die Zellen und ihre Organellen schwellen an, die Plasmamembran reißt und der intrazelluläre Inhalt wird an das umliegende Gewebe verteilt (**Abb.12**) [301]. Dabei werden Hitzeschockproteine (HSPs), Harnsäure oder Kernproteine freigesetzt, die zu einer Aktivierung des Inflammasoms führen und die Sekretion des Zytokins IL-1 (Interleukin-1) zur Folge haben.

Neuere Erkenntnisse haben gezeigt, dass einige Formen der Nekrose kontrolliert ablaufen können, wie z.B. bei Ferroptose, Nekroptose oder Pyroptose [298-300].

1.5.3. Autophagie

Die Autophagie ist ein hochkonservierter, streng regulierter, mehrstufiger Prozess, der als Reaktion auf Stresssignale ausgelöst wird. In erster Linie soll die Autophagie nicht zum Zelltod führen, sondern die Zelle in Stresssituationen entlasten [302]. Je nach Stimuli und Umgebung kann die Autophagie dennoch einen Zelltod herbeiführen [303]. Bei einer Autophagie verdaut sich die Zelle selbst. Dabei bildet sich im ersten Schritt das Phagophor, welches aus einer Doppelmembran besteht und sich ausdehnen kann, bis Teile des Zytosols und Organellen komplett eingeschlossen werden. So entsteht ein komplett geschlossenes Vesikel, welches als Autophagosom bezeichnet wird [304, 305]. Im nächsten Schritt kommt zu der Fusion zwischen dem Autophagosom und einem Lysosom, wodurch der Inhalt des Autophagsoms durch das Autolysosom verdaut wird (**Abb. 12**). Die Autophagie läuft komplett unabhängig von jeglichen Caspasen [281], wird aber von unzähligen ATG (*autophagy related proteins*) Faktoren gesteuert [304]. Zu diesen Faktoren gehört die *Unc-51-like Kinase-1* (ULK1), die durch mTOR oder AMPK (AMP-aktivierte Kinase) phosphoryliert wird. AMPK phosphoryliert ULK1 an Ser317, Ser555 oder Ser777, welches die Autophagie initiiert [306]. Wird ULK1 jedoch von mTOR an Ser757 phosphoryliert, so wird die Interaktion von ULK1 zu AMPK gestört, was eine Hemmung der Autophagie zur Folge hat [307, 308].

Ein weiteres Schlüsselprotein ist LC3 (*light chain 3*), welches der Familie der Mikrotubuli-assoziierten Proteine angehört. LC3 wird als Marker für eine ablaufende Autophagie verwendet [309], da bei der Entstehung des Phagophors und des Phagosoms, die Isoform LC3A in LC3B umgewandelt wird [310, 311]. Beide Formen können per Western Blot Analyse detektiert werden. Das proteolytisch gespaltene LC3B wird an die Membran des Autophagosoms lokalisiert, um direkt mit Autophagie-Rezeptoren interagieren zu können. Ein bekannter Autophagie-Rezeptor ist das p62 (oder auch SQSTM1), welches ubiquitinylierte Proteine erkennt, die für einen Abbau markiert sind. Läuft eine Autophagie ab, so wird p62 ebenfalls abgebaut [312, 313].

1. Einleitung

Die Autophagie spielt eine entscheidende Rolle bei der Zellentwicklung sowie -differenzierung und wirkt in der Bekämpfung gegen Krebszellen [314, 315]. Um Autophagie zu inhibieren, können Krebszellen mit Chloroquin behandelt werden. Chloroquin wurde ursprünglich gegen Malaria eingesetzt, zeigte jedoch auch inhibierende Wirkungen auf die Prozesse der Autophagie [316]. Bei Behandlung mit Chloroquin wird die Fusion zwischen dem Autophagosom und dem Lysosom blockiert und die lysosomale Säuerung verlangsamt [317]. Zellen, in denen die Autophagie geblockt ist, sind gezwungen in Apoptose zu gehen [318].

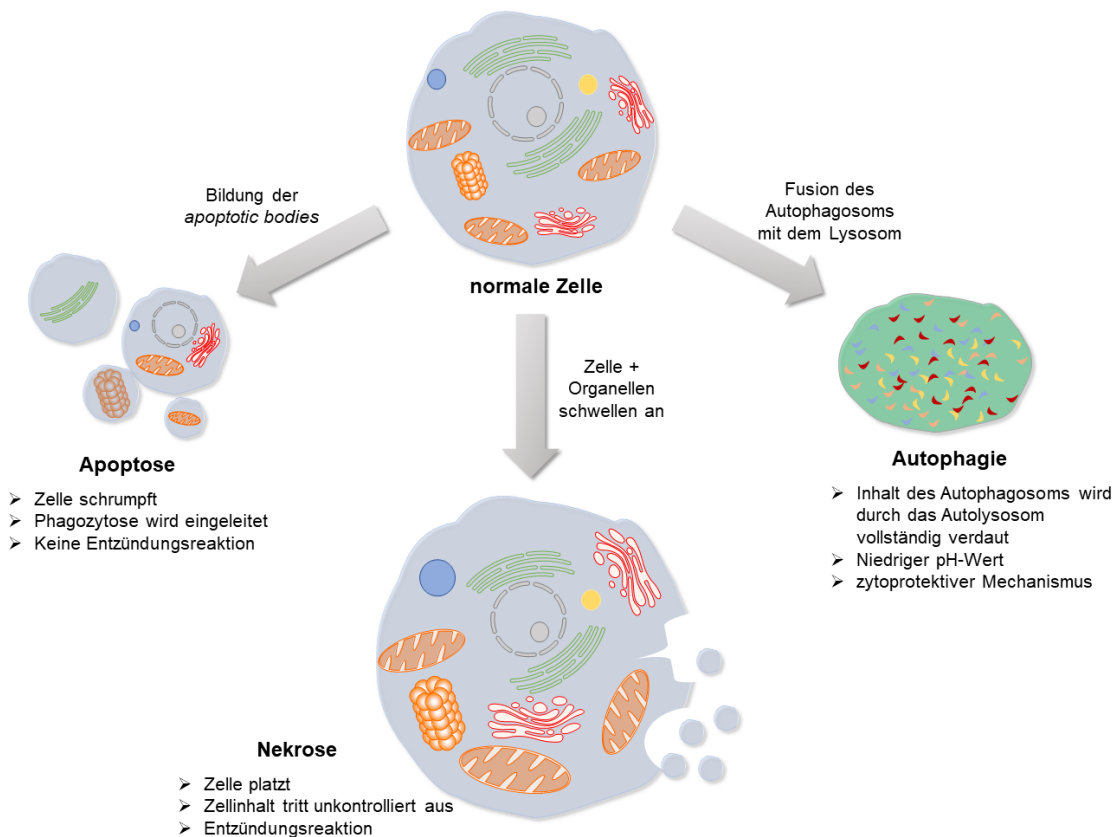


Abbildung 12: **Apoptose, Nekrose und Autophagie im Überblick.** Der direkte Vergleich zwischen kontrolliertem Zelltod (Apoptose) und der Nekrose. Die Autophagie wird in erster Linie aktiv, um die Zelle zu entlasten. Ist die Zelle überbelastet, so kann Autophagie die Apoptose fördern. Diese Abbildung wurde mit den Informationen aus den Quellen [219, 275, 300-302, 304, 305] selbst erstellt.

1.5.4. Mitotische Katastrophe

Eine weitere Art von Zelltod ist die mitotische Katastrophe. Der Mechanismus ist hierbei noch nicht vollständig geklärt, jedoch beruht dieser Zelltod vermutlich auf einer tödlichen Kombination zwischen der Induktion von DNA-Schäden und mangelhafter Zellzykluskontrolle, bei der ein Zellzyklusarrest versagt. Hierbei sind vor allem die Zellen in der G2/M-Phase betroffen, denn die fehlerhafte Chromosomentrennung durch eine gestörte Ausbildung des Spindelapparat in der Anaphase führt schließlich zum Untergang der Zelle. Bei diesem Zelltod wird Caspase-2 aktiviert, welche wiederum Caspase-9, Caspase-3 und Cytochrom C induziert [319]. Außerdem zeichnet sich der Zelltod über eine mitotische Katastrophe durch eine Ausbildung von Mikrokernen (*micronuclei*) aus [320]. Da der Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK die Apoptose in diesen Zellen nicht unterdrücken kann, kann eine mitotische Katastrophe vermutlich ebenfalls Caspase-unabhängig ablaufen [321, 322].

Eine weitere Ursache für die Entstehung einer mitotischen Katastrophe ist eine vorzeitige Einleitung der Mitose, bevor die S- oder die G2-Phase vollständig abgeschlossen werden konnten. Es kommt hierbei zu einer Fusion der mitotischen Zellen mit den Zellen aus der Interphase [319].

Es gibt verschiedene Angriffspunkte, die eine Induktion dieses Zelltodmechanismus fördern. Da der G2/M-Kontrollpunkt hierbei eine zentrale Rolle spielt, sind die Proteine dieses Kontrollpunkts besonders anfällig. So können die Masterkinasen ATM/ATR und ihre direkten Zielproteine CHK1 und CHK2 pharmakologisch inhibiert werden [323-325]. Auch eine Fehlregulation von PLK1 oder 14-3-3 kann in einer mitotischen Katastrophe enden [326]. Darüber hinaus kann die Ausbildung des Spindelapparats und der Spindelfasern direkt angegriffen werden. Dafür werden Substanzen eingesetzt, die zu einer Hyper- oder Depolymerisierung der Mikrotubulis führen [325]. Für eine Hyperpolymerisierung werden Taxane oder Elutherobine verwendet. Die Anwendung von Vinca-Alkaloiden oder Colchizin führt dagegen zu einer Depolymerisierung der Mikrotubulis.

Wie bereits erwähnt, zeigen Krebszellen häufig eine fehlregulierte Kontrolle der Zellzykluskontrollpunkte. Daher sind diese Zellen besonders anfällig für die Induktion einer mitotischen Katastrophe, z.B. durch den Einsatz eines WEE1-Inhibitors [319].

1.6. Hitzeschockproteine und ubiquitinäres Abbausystem

HSPs werden aktiviert, wenn eine Zelle gewissen Stressfaktoren ausgesetzt ist. Diese können Hitzeschock, oxidativer Stress, Proteinfehlfaltung oder Schwermetalle sein. Als Chaperone kontrollieren die HSPs nicht nur eine korrekte Proteinfaltung, sondern stabilisieren diese ebenfalls in Stresssituationen. Die Funktionen der HSPs sind somit essenziell für den korrekten Ablauf bei der Synthese neuer Proteine, bei dem Abbau alter Proteine, bei der korrekten Faltung aller Proteine und bei der Unterbindung zur Bildung von zytotoxischen Proteinaggregaten [327]. Die Chaperone haben direkten Einfluss auf die Überlebens- und Apoptoserate einer Zelle, in dem sie mit Schlüsselkomponenten dieser Signalwege interagieren. Zu den wichtigsten Chaperone gehören die HSP70-, HSP90- und HSP27-Familien. Zu der HSP90-Familie gehören HSP90 β (HSPCB) und HSP90 α (HSPCAL4), zu der HSP70-Familie gehören *heat shock cognates* (HSC) 70 (HS7C) sowie HSP70 (HSPA1A) und HSP27 (HSPB1) gehört zur Familie der HSP27. All diese Familien übernehmen eine zentrale Rolle in der Faltung der Proteine, der Translokation durch zelluläre Kompartimente sowie bei dem proteasomalen Abbau von Proteinen [328].

Die Domänenstruktur der HSP70-Chaperone besteht aus einer N-terminalen ATP-Bindungsstelle (NBD), einer Substrat-Bindungsstelle (SBD) und einer C-terminalen Lid-Domäne, die für die Bindung von Co-Chaperonen zuständig ist. Zu den regulatorischen Co-Chaperonen gehören *BCL-2-associated athanogene* 3 (BAG3) und das Protein HSP40. BAG3 ist ein Nukleotidaustauschfaktor (*nucleotide exchange factor*, NEF) [329]. Die Aktivität von HSP70 ist ATP-abhängig, wobei der Mechanismus der Faltung von Proteinen und der Interaktion von HSP70 mit seinen Co-Chaperonen ein zyklischer Vorgang ist [330]. In der Ausgangsform bindet HSP70 an ATP, während HSP40 an ungefaltete Proteine gebunden ist, um diese vor Aggregation zu schützen [331]. Im nächsten Schritt bindet HSP40 mit dem ungefalteten Protein nun an die Lid-Domäne von HSP70, wobei ATP zu ADP gespalten wird. Während die Affinität von HSP70 zu den Substraten im ATP-gebundenen Zustand gering war, nimmt diese nun durch die Bindung von HSP40 und die Hydrolyse von ATP zu ADP massiv zu. Die NEFs katalysieren im letzten Schritt die Freigabe von ADP und dem Substrat, sodass HSP70 wieder an ATP bindet und der Kreislauf geschlossen wird [330, 332].

Darüber hinaus regulieren die NEFs auch die Lebensdauer und Stabilität des Substrats [333]. Die Chaperone der HSP70 Familie sind etwa 70 kDa groß und liegen in allen Organismen hochkonserviert vor [334]. Eine Aktivierung der Hitzeschockreaktion ist ein zytoprotektiver Mechanismus, wobei die Expression der HSPs in solchen Situationen strengstens reguliert wird [335, 336]. HSC70 wird konstitutiv exprimiert und reguliert die Faltung, Translokation sowie den Abbau von Proteinen im Ruhezustand [337]. Eine Aktivierung von HSC70 ist somit unabhängig vom Zellstress.

In Krebszellen verschafft eine hohe HSP70 Expression einen selektiven Vorteil gegenüber anderen Zellen, da mehrere Zelltodwege, darunter die extrinsische und intrinsische Apoptose und Nekrose, unterdrückt werden. Auch die zelluläre Seneszenz kann beeinflusst werden, wodurch eine Metastasierung gefördert wird [338, 339]. Somit korreliert eine erhöhte Expression an HSP70 mit einer höheren Wachstums- und Überlebensrate des Tumors, was wiederum jedoch mit einer schlechten Überlebenschance des Patienten einhergeht, da eine Resistenz gegenüber Zytostatika aufgebaut wird [340, 341].

Um die Zellproliferation zu hemmen und die Apoptose zu fördern, kann die Aktivität von HSP70 durch das Einsetzen von HSP70 Inhibitoren (HSP70i) verringert werden [342]. Im Rahmen dieser Dissertation wurde JG-98 dafür verwendet, welches die Interaktion zwischen BAG3 und HSP70 unterbindet, in dem es allosterisch an HSP70 bindet. Die Anwendung dieses HSP70 Inhibitors zeigte bereits krebshemmende Wirkungen in Zervixkarzinom- und in Mammakarzinomzellen, wohingegen in normal proliferierenden Fibroblastzellen die zytotoxische Effekte ausblieben [343]. Das spricht dafür, dass die Wirkung von JG-98 auf Krebszellen beschränkt ist [344].

Trotz der hochkonservierten und fein regulierten Chaperon-Maschinerie kommt es nach der Proteinsynthese bei der Proteinfaltung dennoch zu Fehlern. Stressfaktoren können bei ordnungsgemäß gefalteten Proteinen eine Fehlfaltung hervorrufen, wodurch es zu Fehlfunktionen des Proteins kommt, und Aggregatbildung begünstigt. Diese Proteinaggregationen wurden bereits im Zusammenhang mit Morbus Alzheimer, Parkinson, Huntington, der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit oder Typ-2-Diabetes beschrieben [345-349].

1. Einleitung

Um die Proteinhomöostase aufrechtzuerhalten, werden fehlgefaltete Proteine oder Proteinaggregate durch ein Proteinabbausystemen eliminiert. Dazu zählt das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und die Proteolyse. Letzteres wird durch lysosomale Autophagie angetriebenen [345, 346, 350, 351].

Die Aktivierung des UPS erfolgt in drei Schritten. Im ersten Schritt wird Ubiquitin unter ATP-Verbrauch aktiviert, in dem es an das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 (UBE1) gebunden wird. Im zweiten Schritt wird das Ubiquitin auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 D2 (UBE2D2) übertragen und erzeugt ein E2-Ubiquitin-Zwischenprodukt. Der letzte Schritt erfolgt über die E3-Ligase, welches ein Ubiquitinmolekül aus der Ub-E2-Zwischenstufe nimmt und das Substrat damit markiert. Über diese Enzym-Substrat-Kette werden Polyubiquitinketten aufgebaut, welche für die Erkennung durch das Proteasom zuständig sind und somit zum Abbau des Ubiquitin markierten Proteins führen (**Abb. 13**) [352, 353].

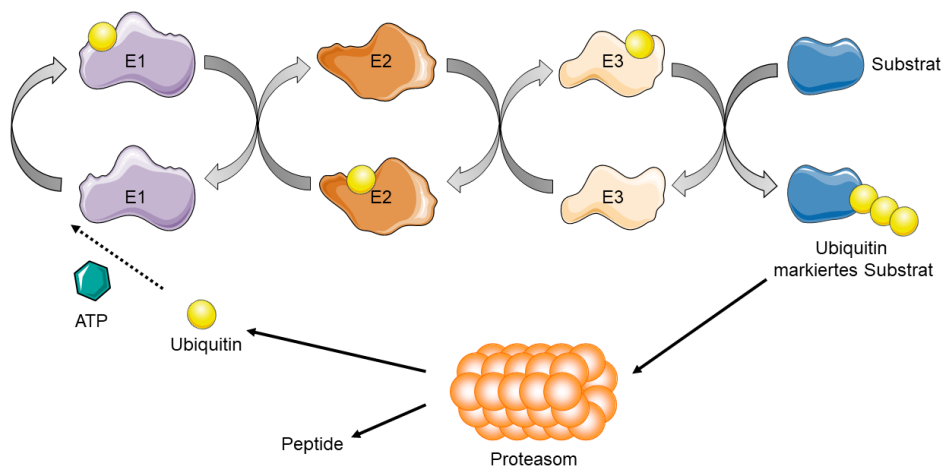


Abbildung 13: **Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems.** Ubiquitin wird unter ATP Verbrauch an E1 gebunden und wird anschließend an das Ubiquitin konjugierende Enzym E2 weitergegeben. E3 ist eine Ligase, die Ubiquitin aufnimmt und Substrate damit markieren, um den Proteasomalen Abbau vorzubereiten. Diese Abbildung wurde mit den Informationen aus den Quellen [352, 353] selbst erstellt.

Derzeit rückt das Proteasom immer mehr in den Fokus der Krebsforschung. Es wurde gezeigt, dass Krebszellen empfindlicher auf proteasomale Inhibitoren reagieren als gesunde Zellen. Bortezomib ist der erste zugelassener Proteasom-Inhibitor, welcher erfolgreich in der Therapie gegen Krebserkrankungen eingesetzt wird. Allerdings kommt es bei PatientInnen häufiger zu Rückfällen, die mit einer Bortezomibresistenz einhergehen. Daher ist es von besonderem Interesse weitere Proteasom-Inhibitoren zu identifizieren, die die Bortezomibresistenz überwinden können und zu dem weniger toxisch sind [354].

Im Rahmen dieser Dissertation wurde für die Inhibierung des Proteasoms Lactacystin verwendet. Die Anwendung des proteasomalen Inhibitors Lactacystin zeigte in Magenkrebszellen [355], Darmkrebszellen [356] und in Melanomzellen [357] eine Zunahme der Apoptose und somit eine antitumorale Eigenschaft.

1.7. Signalwege

1.7.1. MAPK Signalkaskade

Der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweg reguliert lebenswichtige Signaltransduktionswege wie die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung und Apoptose [358-360]. Der Signalweg besteht aus einer Reihe von spezifischen Ser/Thr-Kinasen, die nacheinander durch ihre Vorgänger phosphoryliert und aktiviert werden. Die erste Kinase dieses Signalwegs ist MAPKKK, die durch eine Zelloberflächen-Rezeptor-Kinase phosphoryliert wird oder mit einer GTPase interagiert [361]. In beiden Fällen kommt es zu einer Aktivierung der MAPKKK, wodurch MAPKK phosphoryliert und aktiviert wird. Abschließend erfolgt die Phosphorylierung und Aktivierung von MAPK durch MAPKK. Die Aktivierung von MAPK führt zu einer Phosphorylierung verschiedenster Substrate im Zytosol und im Zellkern, die Veränderungen in der Proteinfunktion und der Genexpression bewirken [362]. Die MAP-Kinasen können in drei Hauptfamilien eingeteilt werden. Diese sind ERK (extrazellulär-signalregulierte Kinasen), JNKs (Jun amino-terminale Kinasen) und p38/SAPK (stressaktivierte Proteinkinasen).

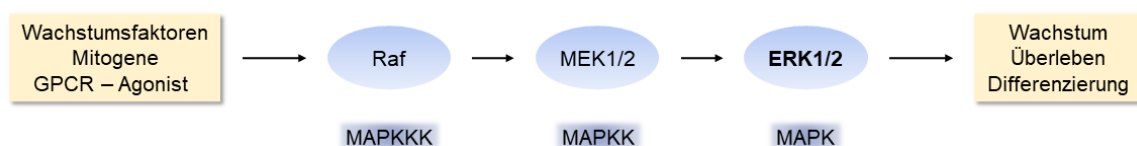


Abbildung 14: **Die MAPK-Signalkaskade.** Die Signalkaskade wird durch RTKs, GPCRs, Integrine oder die GTPase Ras aktiviert. MAPKKK wird phosphoryliert, wodurch MAPKK und MAPK ebenfalls phosphoryliert und aktiviert werden. Diese Signalkaskade führt zum Überleben, Wachstum und Differenzierung der Zellen. Diese Abbildung wurde mit den Informationen aus den Quellen [358-362] selbst erstellt.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Fokus auf die MAPK ERK1/2 gelegt, welche primär durch Wachstumsfaktoren das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung regulieren. Wichtige Auslöser dieser MAPK-Signalkaskade sind Zelloberflächen-Rezeptoren wie RTKs, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), Integrine, sowie die GTPase Ras [358]. Die MAPKK MEK1/2 phosphoryliert ERK1/2 zunächst an Tyr204/187 und anschließend an Thr202/185. Beide Phosphorylierungsstellen sind essenziell für eine Aktivierung von ERK1/2 [363] (**Abb. 14**).

Aufgrund der hohen Anzahl an Substraten und der damit verbundene Beteiligung an den Signalwegen ist es nicht verwunderlich, dass der MAPK Signalweg in Krebserkrankungen als der am häufigsten mutierter Signalweg beschrieben wird [216, 364]. Die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade ist bei einem Drittel aller humanen Krebsarten mutiert und übermäßig aktiviert, wodurch die Forschung für eine Inhibierung der spezifischen Proteine dieser Signalkaskade eine besondere Wichtigkeit in der Bekämpfung gegen Krebserkrankungen erlangt. In **Kapitel 1.1.1.** wurde in Pankreaskarzinomzellen bereits eine häufige Mutation von Ras beschrieben, welche mit einer Überexprimierung des MAPK Signalwegs verbunden ist [216]. Dies ist unter anderem der Grund für die gesteigerte Zellproliferation und das Überleben dieser Zellen [216, 365]. Bis heute zeigte sich jedoch nur die Hemmung von B-Raf als therapeutisch wirksam [363]. Neueste Studien zeigen eine Wirksamkeit in der Kombination zwischen dem B-Raf Inhibitor Dabrafenib und dem MEK Inhibitor Trametinib. Diese Kombinationstherapie wird bei der Behandlung von Kindern mit niedriggradigem Gliom [366], bei einem nicht-resezierbaren oder metastasierten Melanom [367] oder zur Behandlung des fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms [368], angewendet.

1.7.2. PI3K/AKT Signalweg

Konstitutiv aktives AKT ist neben ERK1/2 für eine erhöhte Zellproliferation in humanen Krebszellen verantwortlich [369]. Auch der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K)/AKT-Signalweg wird als einer der am häufigsten überaktivierten Signalwege bei verschiedenen humanen Krebsarten beschrieben. Der PI3K/AKT Signalweg reguliert zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, Zellzyklus und die Induktion von Apoptose [370]. In Krebszellen ist dieser Signalweg vor allem in Überlebensmechanismen involviert, weshalb die Fehlregulation aufgrund einer Mutation für die Entwicklung einer Arzneimittelresistenz verantwortlich ist [371].

AKT, oder auch Proteinkinase B (PKB), wird durch PI3K direkt reguliert. PI3K gehört zu der Familie der Lipidkinase und wird durch eine Phosphorylierung an der Hydroxylgruppe des Inositolrings aktiviert. Die Aktivierung von PI3K kann auf zwei Wegen erfolgen. Zum einen können Wachstumsrezeptoren wie EGFR (*epidermal growth factor receptor*), FGFR (*fibroblast growth factor receptor*) oder IGFR (*insulin-like growth factor receptor*) an die RTK binden, welche zu einer Autophosphorylierung dieser Kinase führt und gleichzeitig eine Rekrutierung sowie eine Aktivierung von PI3K hervorruft [372-374]. Andererseits kann eine direkte Interaktion von GTPasen (z.B. Ras) eine Aktivierung von PI3K auslösen, welche essenziell für das Überleben und der Zellproliferation von Krebszellen ist [374, 375]. Aktives PI3K phosphoryliert PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat), wodurch PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat) entsteht [376]. Das PIP3 bindet im letzten Schritt an die Ser/Thr-Kinase AKT, wodurch eine Phosphorylierung von AKT an Thr308 durch *phosphoinositide dependent protein kinase 1* (PDK1) ausgelöst wird [377]. Eine maximale Aktivierung kann erst gewährleistet werden, wenn der mTOR-Komplex 2 (mTORC2) [378] und die DNA-PK [379] die Proteinkinase Akt an Ser473 phosphorylieren. Beide Phosphorylierungsstellen sind essenziell und bestimmen die Aktivität dieses Proteins [377]. Die Dephosphorylierung von PIP3 zu PIP2 wird durch *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) katalysiert (**Abb. 15**).

1. Einleitung

Es gibt mehrere Isoformen von AKT, die durch verschiedene Signale unterschiedlich aktiviert sein können (AKT1, 2, 3) [380]. Zu den Zielproteinen von AKT gehören die apoptotischen Proteine wie BAX und BAD, aber auch mTOR, FOXO und p21 können direkt durch AKT reguliert werden. AKT kann die Apoptose inhibieren [381] und gleichzeitig die Proteintranslation durch mTOR (mTORC1) antreiben [382]. FOXO ist ein Protein, welches durch eine negative Regulation, die Zellteilung kontrolliert. Der erhöhte Abbau von FOXO durch AKT treibt die Zellteilung an und fördert ebenfalls das Überleben der Zellen [383].

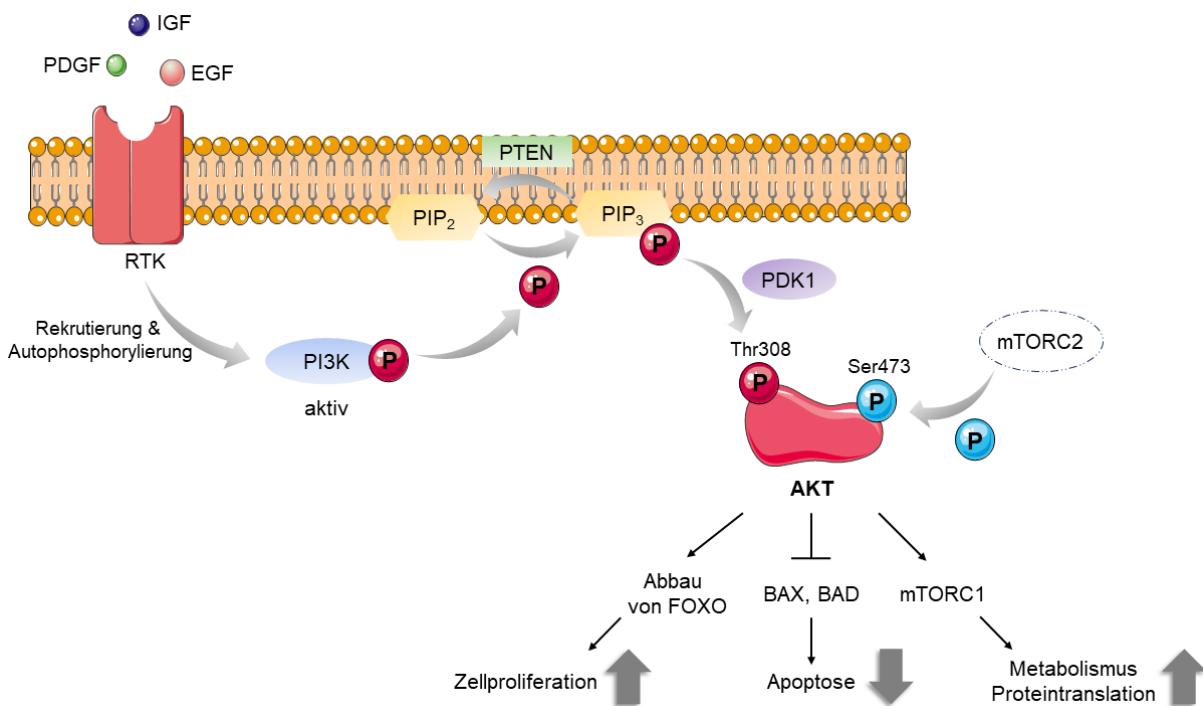


Abbildung 15: **Der PI3K/AKT Signalweg.** PI3K kann durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie IGF, EGF und PDGF aktiviert werden. Die Bindung der Wachstumsfaktoren an die RTK führt zu einer Dimerisierung der Rezeptorkinase. Dieser Vorgang ist essenziell für die Aktivierung. PI3K wird anschließend rekrutiert und autophosphoryliert, wodurch diese nun aktiviert wird. Im aktiven Zustand phosphoryliert PI3K das Membranprotein PIP₂, wodurch PIP₃ erzeugt wird. Durch die Phosphatase PTEN kann dieser Vorgang rückgängig gemacht werden. PIP₃ veranlasst die Phosphorylierung von AKT durch PDK1 an Thr308 und aktiviert AKT somit teilweise. Eine vollständige Aktivierung kann erst durch eine Phosphorylierung durch den Komplex mTORC2 an Ser473 gewährleistet werden. Aktives AKT/PKB ist in der Lage Zellproliferation, Zellteilung und Zellüberleben anzutreiben, während Apoptose gleichzeitig unterdrückt werden kann. Diese Abbildung wurde mit den Informationen aus den Quellen [372-374, 377, 378, 384] selbst erstellt.

All diese Faktoren unterstreichen die Wichtigkeit von AKT; eine Fehlregulation dieses Proteins führt nicht nur zu erhöhten Überlebenschancen und verstärkte Proliferation von Krebszellen, sondern fördert auch eine Resistenz gegen Chemotherapien. Das macht nicht nur AKT, sondern auch PI3K zu interessanten und vielversprechenden therapeutischen Angriffspunkten in der Krebsforschung.

2. Zielsetzung

Das duktales Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse (PDAC) ist eine äußerst aggressive Tumorart, die aufgrund ihrer Schwierigkeit in der Behandlung und ihrer leider fast immer tödlichen Natur besonders herausfordernd ist. Die bisherigen Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppe von Professor O. H. Krämer legen nahe, dass die regulatorische Untereinheit PPP2R3A/PR130 eine kontextabhängige, onkogene Funktion aufweist. Daher konzentriert sich diese Arbeit auf die molekulare Charakterisierung der biologischen Funktionen der PP2A-Untereinheit PR130 in den verschiedenen Subtypen des Pankreaskarzinoms. Des Weiteren sollen mechanistische PP2A/PR130-basierte Therapien und Strategien im Zusammenhang mit dem Pankreaskarzinom entwickelt und etabliert werden.

Um die Bedeutung von PP2A/PR130 nachzuweisen, soll überprüft werden, ob die pharmakologische Hemmung dieses Proteinkomplexes eine potenziell neue therapeutische Möglichkeit für das Pankreaskarzinom darstellt. Darüber hinaus sollen vielversprechende Kombinationstherapien auf der Basis von PP2A gefunden und vorangetrieben werden. Für die pharmakologische Hemmung von PP2A in PDAC wird in dieser Arbeit das niedermolekulare PD eingesetzt, welches spezifisch PP2A inhibiert, ohne dabei andere Proteinphosphatasen wie PP1-C α oder PP1-C β zu beeinflussen. Die biochemischen Effekte von PD sollen in verschiedenen Zelllinien, darunter murine und humane PDAC Zellen, leukämische Zellen, normal proliferierenden Zellen und in Immunzellen, aufgezeigt werden. Dabei werden der Zellzyklus, die Zelltodrate der untersuchten Zelllinien sowie die Aktivierung verschiedener Signalwege durch durchflusszytometrische Messungen, Western Blot- und Proteomanalysen, konfokale Mikroskopie sowie genetische Manipulationen mittels siRNA und CRISPR-Cas9 Technologie dargestellt.

In neurologischen Erkrankungen hat die Inhibierung von PP2A zu einer Akkumulation von zytotoxischen Proteinaggregaten geführt. Diese Beobachtung gibt Anlass zur nächsten Fragestellung dieser Forschungsarbeit: Wird nach einer Hemmung von PP2A in Tumorzellen ebenfalls eine Bildung von Proteinaggregaten beobachtet? Von besonderem Interesse ist dabei, welche Auswirkungen diese Anhäufung fehlgefalteter Proteine in Tumorzellen hat, ob dies therapeutisch nutzbar ist und ob die spezifische PP2A-Untereinheit PR130 die Bildung von Proteinaggregaten in Tumorzellen kontrolliert.

2. Zielsetzung

Im Verlauf dieser Dissertation werden gezielt Experimente durchgeführt, um einen Lösungsansatz für dieser Fragestellung zu liefern. Da hier speziell der ordnungsgemäße Abbau von Proteinen untersucht wird, erfolgt eine detaillierte Analyse der Rolle der HSPs Familie sowie des UPS im Kontext von PR130.

Die HU-abhängige Induktion der DNA-Schadensantwort und der Checkpoint-Kinasen soll in Kombination mit dem HDACi MS-275 in murinen PDAC Zellen untersucht werden, da sowohl HU als auch Entinostat seit Jahrzehnten vielversprechende Therapieansätze in der allgemeinen Krebsforschung darstellen. Des Weiteren sollen die pharmakologischen Effekte und die damit verbundene Wirksamkeit des TOP-1-Inhibitors IT, sowie des RNRi COH29 im murinen PDAC Zellsystem analysiert werden. Eine weitere zentrale Fragestellung dieser Arbeit betrifft die Möglichkeit eines therapeutischen Ansatzes durch die Beeinflussung des Zellzyklus in mit PD behandelten PDAC Zellen. Hierbei steht zunächst die Klärung im Fokus, ob und in welcher Zellzyklusphase PD einen Arrest bewirkt und ob dieser Zellzyklusstopp zu vermehrtem Zelltod führt oder nicht. Parallel dazu wird angestrebt, eine Kombinationstherapie offen zu legen, die eine synergistische Wirkung mit PD zeigt und somit maßgeblich zur Bekämpfung des PDAC beiträgt.

Die Untersuchungen der genannten Fragestellungen soll wesentlich zur Charakterisierung der PDAC Subtypen beitragen und möglicherweise neue, zielgerichtete Therapieansätze für die Behandlung des PDAC aufzeigen.

3. Material

3.1. Chemikalien

Im folgenden Kapitel werden alle Chemikalien aufgelistet, die im Rahmen dieser Dissertation verwendet wurden.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien.

Name	Abkürzung	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aceton	-	Applichem, Darmstadt
Acrylamid Rotiphorese® Gel 40	-	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	APS	Roth, Karlsruhe
Annexin V-FITC	-	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Bovines Serumalbumin	BSA	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	-	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	CaCl ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim
cOmplete™ Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	-	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue (50 mg/500 mL)	-	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid	DMSO	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol	DTT	PanReac AppliChem, Darmstadt
Ethanol	EtOH	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat	EDTA	Applichem, Darmstadt
Formaldehyd (37 %)	-	Roth, Karlsruhe
Glycerin	-	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	-	Roth, Karlsruhe
Lipofectamin® RNAiMAX Reagent	-	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig

3. Material

Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Cas9 Transfektionsreagenz	-	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Magermilchpulver	TM	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	MeOH	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat	SDS	Roth, Karlsruhe
<i>NEWBlot™ Nitro Strippingbuffer</i>	-	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Nonidet®-P40	NP-40	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>PageRuler Plus Prestained Protein Ladder</i>	-	Thermo Scientific, Braunschweig
<i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i>	-	Thermo Scientific, Braunschweig
Phosphataseinhibitor-Cocktail	-	Sigma-Aldrich, München
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	PBS	Merck Millipore, Darmstadt
Phosphorsäure	-	Roth, Karlsruhe
Propidiumiodid	PI	Sigma-Aldrich, München
RNase A	-	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (37 %)	HCl	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (≥ 99 % p.a.)	TEMED	Thermo Scientific, Braunschweig
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	TRIS	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	-	Sigma-Aldrich, München
Trypsin- Ethylendiamintetraessigsäure (10x)	Trypsin/EDTA	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Tween® 20	-	Roth, Karlsruhe
Vectashield®	-	Biozol, Vec-H-1,000
Western Lightning Plus-ECL	ECL	PerkinElmer, Waltham, USA

3.2. Inhibitoren

Alle verwendeten Inhibitoren werden in der **Tabelle 3** aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Inhibitoren.

Name	Wirkung	Artikelnummer	Hersteller
Chloroquin	Autophagie-Inhibitor	S6999	Selleck Chemicals, München
COH29	RNR-Inhibitor	S0283	Selleck Chemicals, München
MS-275	HDAC1/2/3-Inhibitor	S1053	Selleck Chemicals, München
Hydroxyurea	RNR-Inhibitor	H8627	Sigma-Aldrich, München
Irinotecan	Topoisomerase-I- Inhibitor	S1198	Selleck Chemicals, München
JG-98	HSP70-Inhibitor	S6721	Selleck Chemicals, München
KU-60019	ATM- Inhibitor	S1570	Selleck Chemicals, München
Lactacystin	irreversibler Proteasom-Inhibitor	L6785	Sigma-Aldrich, München
MK-1775	WEE1-Inhibitor	S1525	Selleck Chemicals, München
PD	PP2A-Inhibitor	496383	Sigma-Aldrich, München
Z-VAD-FMK	Caspase-Inhibitor	S7023	Selleck Chemicals, München

3. Material

3.3. Puffer und Lösungen

Es werden im Folgenden alle Puffer und Lösungen aufgelistet, die verwendet wurden, um bestimmte Assays durchzuführen (**Tabelle 4**).

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer	Zusammensetzung
Durchflusszytometrische Analysen	
PBS (pH 7,4)	9,55 g/L in dest. Wasser
80 % EtOH	800 mL 100 % EtOH 200 mL dest. Wasser
RNase A [10 mg/mL]	1 µL in 333 µL PBS
PI-Lösung [50 µg/mL]	2,5 mL PI-Stammlösung [1 mg/mL] in 47,5 mL dest. Wasser
Annexin V-Bindepuffer (10x)	100 mM HEPES 1,4 M NaCl 25 mM CaCl ₂ 1 % BSA
Annexin V-Bindepuffer (1x)	5 mL 10x Annexin V-Bindepuffer 45 mL dest. Wasser
Aggresom Detektionsassay	
1x Assay Puffer	5 mL 10x Assay Puffer 45 mL dest. Wasser
Fixierungspuffer	600 µL 37 % Formaldehydlösung 14,4 mL 1x Assay Puffer
Permeabilisierungspuffer	50 µL Triton X-100 60 µL 0,5 M EDTA (pH 8) 9,89 mL 1x Assay Puffer
Aggresom-Detektions-Reagenz	1 µL Aggresom-Detektions-Reagenz 5 mL 1x Assay Puffer

SDS-PAGE und Western Blot Analysen

NET-N Lysepuffer (0,5 %)	100 mM NaCl 10 mM 1M Tris-HCl (pH 8) 10 % Glycerin 1 mM EDTA 0,5 % NP-40 <u>Zusätze, die frisch dazu gegeben werden:</u> Proteaseinhibitorcocktail-Tablette/10 mL Phosphatase Inhibitor 1:100 1 mM DTT
10x TBS Waschpuffer (pH 7,6)	20 mM TRIS 1,4 M NaCl
1x TBS-T (0,05 %)	100 mL 10x TBS 900 mL dest. Wasser 0,5 % Tween® 20
Blockier-Lösung	5 g TM 100 mL 1x TBS-T
5x Lämmli-Puffer	30 g TRIS 144 g Glycin Mit dest. Wasser auf 1 L auffüllen
6x Probenpuffer	375 mM Tris, pH 6,8 12 % SDS 30 % Glycerin 500 mM DTT 0,01% Bromphenolblau 2 mL Aliquots bei -20 °C lagern
SDS-Elektrophoresepuffer	200 mL 5x Lämmli-Puffer 800 mL dest. Wasser 10 mL 10 % SDS
Transferpuffer	100 mL 5x Lämmli-Puffer 200 mL 100 % EtOH 700 mL dest. Wasser

3. Material

10 % SDS	10 g SDS 100 mL dest. Wasser
10 % APS	10 g APS 100 mL dest. Wasser 1 mL Aliquots bei -20 °C lagern
1 M TRIS/HCl (pH 6,8)	60 g Tris ad 500 mL H ₂ O bidest.
1,5 M TRIS/HCl (pH 8,8)	90,83 g Tris ad 500 mL H ₂ O bidest.

Immunfluoreszenz

Blockier-Lösung	1 g BSA 60 µL Triton X-100 20 mL 1x PBS
70 % EtOH	700 mL EtOH 300 mL dest. Wasser
Methanol/Aceton (7:3)	35 mL Methanol 15 mL Aceton Lagerung bei -20 °C
Hochsalz (<i>high salt</i>) PBS	11,68 g NaCl 500 mL 1x PBS

Bradford Assay

Bradford Reagenz	50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 50 mL Phosphorsäure 25 mL EtOH mit dest. Wasser auf 500 mL auffüllen 2x filtrieren, lichtgeschützt bei 4 °C lagern
------------------	---

3.4. Antikörper

3.4.1. Primäre Antikörper

Alle primären Antikörper, die für die Dissertation benötigt waren, werden in **Tabelle 5** aufgelistet. Die Primärantikörper wurden für die Detektion von Proteinen im Western Blot in 2% TM/TBS-T gelöst. Für die Verwendung in der Immunfluoreszenz wurden die Antikörper in der Blockier-Lösung gelöst.

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper.

Name	Wirt	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
AKT	Kaninchen	1:1000	abcam-32505	Abcam, Cambridge, UK
ATM	Kaninchen	1:500	cs-2873	Cell Signaling, Frankfurt/Main
CHK1	Maus	1:500	cs-2360	Cell Signaling, Frankfurt/Main
cleaved caspase-3	Kaninchen	1:500	cs-9661	Cell Signaling, Frankfurt/Main
cleaved PARP	Maus	1:500	552596	BD Bioscience, Heidelberg
E-Cadherin	Kaninchen	1:500	cs-3795	Cell Signaling, Frankfurt/Main
HSP105	Maus	1:1000	sc-74550	Santa Cruz, Heidelberg
HSP27/HSPB1	Maus	1:1000	sc-13132	Santa Cruz, Heidelberg
HSP70	Maus	1:1000	sc-66048	Santa Cruz, Heidelberg
HSP90	Maus	1:1000	sc-13119	Santa Cruz, Heidelberg
p21	Kaninchen	1:500	ab-109199	Abcam, Cambridge, UK

3. Material

p53	Kaninchen	1:500	NCL-p53- CM5p	Novocastra Leica Biosystems, Wetzlar
p53-DO1	Maus	1:5000	sc-126	Santa Cruz, Heidelberg
p-AKT (Ser473)	Kaninchen	1:1000	cs-9271S	Cell Signaling, Frankfurt/Main
p-ATM (Ser1981)	Kaninchen	1:500	ab81292	Abcam, Cambridge, UK
p-CHK1 (S345)	Kaninchen	1:500	cs-2348S	Cell Signaling, Frankfurt/Main
p-ERK1/p- ERK2 (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	1:1000	cs-9101	Cell Signaling, Frankfurt/Main
p-KAP1 (Ser824)	Kaninchen	1:5000	NB100-2350	Novus Biologicals, Wiesbaden
PP2A-A	Kaninchen	1:1000	cs-2039	Cell Signaling, Frankfurt/Main
PP2A-C	Kaninchen	1:1000	cs-2259	Cell Signaling, Frankfurt/Main
PR130	Kaninchen	1:500	NBP1-87233	Novus Biologicals, Wiesbaden
RAD51	Kaninchen	1:1000	sc-8349	Santa Cruz, Heidelberg
RRM2	Kaninchen	1:1000	PA5-13570	Thermo Fisher Scientific, Frankfurt/Main
Ubiquitin (Lys48)	Kaninchen	1:300 (IF)	05-1307	Merck, Darmstadt
Vimentin	Maus	1:5000 1:400 (IF)	sc-6260	Santa Cruz, Heidelberg
Vinculin (7F9)	Maus	1:1000	sc-73614	Santa Cruz, Heidelberg

β -Actin	Maus	1:1000	sc-47778	Santa Cruz, Heidelberg
γ -H2AX (Ser139)	Kaninchen	1:1000 1:500 (IF)	cs-9718	Cell Signaling, Frankfurt/Main

3.4.2. Sekundäre Antikörper

Im Folgenden werden die Sekundärantikörper gelistet, die für die Detektion von Proteinen in der Immunfluoreszenz oder Western Blot Methode verwendet wurden (**Tabelle 6**).

Tabelle 6: Alle verwendeten Sekundärantikörper.

Name	Wirt	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
Infrarot-Farbstoff-konjugierte Antikörper				
IRDye® 680RD anti-Kaninchen IgG	Ziege	1:10.000	925-68071	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
IRDye® 680RD anti-Maus IgG	Ziege	1:10.000	925-68070	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
IRDye® 800CW anti-Kaninchen IgG	Ziege	1:10.000	925-32211	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
IRDye® 800CW anti-Maus IgG	Ziege	1:10.000	925-32210	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Fluorophor-konjugierte Antikörper				
Alexa Fluor® 488 F(ab'2) anti-Maus IgG (H+L)	Ziege	1:300	A11017	Thermo Fischer, Frankfurt/Main
Cy3 anti-Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	1:300	111-165-144	Dianova, Hamburg

3. Material

3.5. siRNA und sgRNA

Alle verwendeten siRNAs für eine transiente und sgRNAs für eine stabile Transfektion werden in **Tabelle 7** aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete siRNAs und sgRNAs.

Name	Stammkonzentration	Artikelnummer	Hersteller
Kontroll-siRNA-A	10 μ M	sc-37007	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Kontroll-siRNA-B	10 μ M	sc-44230	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Kontroll-siRNA-C	10 μ M	sc-44231	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
PR130 siRNA (h)	10 μ M	4392420	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
PR130 siRNA (ms)	10 μ M	sc-108917	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
PPP2R3A sgRNA (h)	20 μ M	Hs.Cas9.PPP2 R3A.1.AA	Integrated DNA Technologies, Iowa,USA
PPP2R3A sgRNA (h)	20 μ M	Hs.Cas9.PPP2 R3A.1.AB	Integrated DNA Technologies, Iowa,USA
Cas9-GFP	62 μ M	CAS9GFPPRO	Sigma-Aldrich, München

3.6. Kits

Für die Detektion von Aggresomen wurde das Aggresomsdetektionskit von Abcam (ab139486), Cambridge, United Kingdom verwendet.

3.7. Geräte

Geräte, die für die Durchführung der Experimente genutzt wurden, werden in **Tabelle 8** aufgelistet.

Tabelle 8: Verwendete Geräte.

Name	Hersteller
Absaugpumpe <i>Vacusafe</i>	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Autoclave 5075 ELV	Tuttnauer Europe B.V., Breda, NL
Blottingapparatur Mini <i>Trans-Blot Cell</i> ®	Bio-Rad, München
CO ₂ -Inkubator HeraCell™	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Durchflusszytometer FACS Canto™ II	BD Biosciences, Heidelberg
Elektrophoreseapparatur	Bio-Rad, München
ECHO Rebel Hybridmikroskop	Discover ECHO, San Diego, USA
Feinwaage Basic	Sartorius Laboratory, Göttingen
Fluorescence Microplate Reader TriStar2 Multimode Reader LB942	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Fluoreszenz-Mikroskop	Nikon Instruments, Düsseldorf
Gelgießapparatur	Bio-Rad, München
Heizblock Thermomixer <i>Comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
iBright CL1000	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Konfokales Mikroskop LSM710	Zeiss, Oberkochen
Lichtmikroskop Axiovert 35	Zeiss, Oberkochen
Mehrfachdispenser-Pipette	Brand, Wertheim
<i>Microplate Reader Sunrise</i>	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikroskop Zeiss Primovert	Zeiss, Oberkochen
Mikrozentrifuge	Roth, Karlsruhe
Neubauer Zählkammer	Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen
<i>Odyssey</i> ®-Infrared Imaging-System	Li-COR Biosciences, Bad Homburg
pH-Meter <i>FiveEasy</i> ™ FE20	Mettler Toledo, Gießen
Pipetten, <i>Pipet-Lite</i> XLS	Mettler Toledo, Gießen
<i>Pipet-boy</i> , <i>Pipet-X</i>	Mettler Toledo, Gießen
Rollenmischer RS-TR05	Phoenix Instruments

3. Material

Rührplattform Variomag Mono	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
<i>Sonifyer UP2200Ht ultrasonic processor</i>	Hielscher, Berlin
Spannungsquelle PowerPacTM HC	Bio-Rad, München
Sterilbank <i>Lamin Air</i> HB2472	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühler (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Tiefkühler (-80°C)	SANYO, München
Tischzentrifuge	Roth, Karlsruhe
Waage Precisa Junior 500	Precisa
Wasseraufbereitungssystem PURELAB Classic	ELGA LabWater
Wasserbad AQUALine AL5	Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig

3.8. Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Materialien, die für den alltäglichen Gebrauch im Labor genutzt wurden, werden in **Tabelle 9** zusammengefasst.

Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Name	Hersteller
CELLStar® Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
CELLStar® Zellkulturflaschen (40 mL, 200 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
CELLStar® Zellkulturflaschen (6, 12, 24, 48, 96 wells)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
CELLStar® Zellkulturschalen (Ø6 cm, Ø10 cm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Combitips® (5 mL)	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser	Roth, Karlsruhe

FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon™-Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Glaswaren	Schott Duran, Mainz
Kryoröhrchen	Roth, Karlsruhe
Mikrotiterplatten	Bemis, Meckenheim
Mini PROTEAN® Glasplatten	Bio-rad, Feldkirchen
Nitrozellulosemembran, Amersham™ Protran™ 0.2 µM NC	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Parafilm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 mL)	Eppendorf, Hamburg
Whatman-Filterpapier	VWR, Darmstadt
Zellkulturflasche, T-25 und T-75: Standard Filterkappe	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen (Ø6 cm, Ø10 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (15/50 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

3.9. Medien und Medienzusätze

Alle verwendeten Medien und Medienzusätze werden in der **Tabelle 10** aufgelistet.

Tabelle 10: Medien und Medienzusätze.

Name	Artikelnummer	Hersteller
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	D0819	Sigma-Aldrich, München

3. Material

RPMI – 1640 (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)	R8758	Sigma-Aldrich, München
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	S0615	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/Streptomycin	P4333	Thermo Fischer, Frankfurt/Main
Natriumpyruvat (100 mM)	L0473	Biochrom, Berlin
Opti-MEM®	31985-070	Gibco Life Technologies, Karlsruhe

3.10. Zelllinien

Im Folgenden werden alle Zelllinien aufgelistet, die für die Bearbeitung der Fragestellung dieser Dissertation von Nöten war.

Tabelle 11: Verwendete Zelllinien.

Name	Herkunft	Merkmale/ Mutationen	Medium
Adhärente Zelllinien			
3250 [385]	murine PDAC Zelllinie, aus primären Pankreastumor isoliert	KRAS-mutiert p16-Deletion p53-mutiert	DMEM, 10 % FCS
8248 [385]	murine PDAC Zelllinie, aus primären Pankreastumor isoliert	KRAS-mutiert p16-Deletion p53-mutiert	DMEM, 10 % FCS
8296 [385]	murine PDAC Zelllinie, aus primären Pankreastumor isoliert	KRAS-mutiert p16-Deletion p53-mutiert	DMEM, 10 % FCS
9591 [385]	murine PDAC Zelllinie, aus primären Pankreastumor isoliert	KRAS-mutiert p16-Deletion p53-mutiert	DMEM, 10 % FCS

BxPC-3 [386-389]	humane PDAC Zelllinie, wurde aus einer 61-jährigen Frau isoliert	KRAS-Wildtyp p16-wildtyp-Sequenz, aber keine Expression des Proteins Smad4-Deletion	RPMI, 10 % FCS
DAN-G [390-392]	humane PDAC Zelllinie, wurde im Jahre 1985 aus dem Tumor einer 68-jährigen Frau isoliert	KRAS-mutiert p53-negativ	RPMI, 10 % FCS
MIA PaCA-2 [393, 394]	humane PDAC Zelllinie, wurde im Jahre 1975 aus dem Tumor eines 65-jährigen kaukasischen Mann isoliert	KRAS-mutiert p53-mutiert p16-Deletion	DMEM, 10 % FCS
PANC-1 [393, 395]	humane PDAC Zelllinie, wurde aus dem Tumor eines 56-jährigen Mann isoliert	KRAS-mutiert p53-mutiert p16-Deletion	DMEM, 10 % FCS, Na-Pyruvat
PSN-1 [393, 396]	humane PDAC Zelllinie, wurde aus dem Tumorgewebe eines Mannes isoliert, welches 1,5 Jahre bei -80 °C gelagert wurde	KRAS-mutiert p53-mutiert p16-Deletion Smad4-mutiert	RPMI, 10 % FCS
RPE-1 [397]	Humane Zelllinie, weiblich, wurde aus der Retina isoliert,	keine bekannt	DMEM, 10 % FCS, Na-Pyruvat
S411 [385]	murine PDAC Zelllinie, aus primärem Pankreastumor isoliert	KRAS-mutiert p16-Deletion p53-mutiert	DMEM, 10 % FCS
S821 [385]	murine PDAC Zelllinie, aus primärem Pankreastumor isoliert	KRAS-mutiert p16-Deletion p53-mutiert	DMEM, 10 % FCS

3. Material

W22 [385, 398]	murine PDAC Zelllinie, aus primärem Pankreastumor isoliert	p53-Deletion	DMEM, 10 % FCS
-------------------	--	--------------	-------------------

Suspensionszelllinien

HEL [399]	wurde 1980 aus dem peripheren Blut eines 30- jährigen Mannes mit Erythroleukämie (AML M6), bei einem Rezidiv nach einer Hodgkin-Lymphom Behandlung, isoliert	JAK2 ^{V617F} -Mutation p53-mutiert p16-mutiert	RPMI, 20 % FCS
--------------	--	---	-------------------

HEL ΔSIAH2	Abkömmling von HEL Zellen	JAK2 ^{V617F} -Mutation p53-mutiert p16-mutiert SIAH2 CRISPR-Cas9 Knockout	RPMI, 20 % FCS
------------	---------------------------	---	-------------------

K562 [400]	CML-Zelllinie, wurde aus einer 53-jährigen Frau isoliert	p53-mutiert	RPMI, 10 % FCS
---------------	---	-------------	-------------------

MV4-11 [401]	AML-Zelllinie, wurde aus einem 10-jährigen Jungen isoliert	FLT3-Mutation p53-Wildtyp	RPMI, 10 % FCS
-----------------	--	------------------------------	-------------------

RAMOS [402]	B-Lymphozyten-Zelllinie, wurde aus einem 3-jährigen Jungen mit Burkitt-Lymphom isoliert	p53-mutiert MYC- Überexpression	RPMI, 10 % FCS
----------------	--	---------------------------------------	-------------------

RS4-11 [403]	ALL-Zelllinie, wurde aus dem Knochenmark einer 32-jährigen Frau isoliert	p53-mutiert	RPMI, 10 % FCS
-----------------	--	-------------	-------------------

Alle verwendeten Zelllinien wurden negativ auf Mykoplasmen getestet. Die PDAC Zelllinien wurden maximal 12 Mal umgesetzt (passagiert), ehe sie verworfen wurden. Darüber hinaus wurde die Identität der MIA PaCa-2 Zellen zusätzlich durch einen DNA-Fingerabdruck authentifiziert (DSMZ, Braunschweig).

3.11. Softwares

Die **Tabelle 12** fasst alle Softwares zusammen, die nötig waren, um Daten dieser Dissertation zu generieren oder auszuwerten.

Tabelle 12: Genutzte Softwares.

Name	Hersteller
Cell ^A Imaging Software	Olympus Soft Imaging Solutions, Münster
EndNote Version X9	Thomson Reuters, New York, USA
FACSDiva TM 7.0	BD Biosciences, Heidelberg
GraphPad Prism 8.3.0.	Graph Pad Software, La Jolla, USA
ICE Software 1.0.6.13	Berthold Technologies, Bad Wildbad
ImageJ	Wayne Rasband
Image Studio Lite V. 5.2.	Li-COR Biosciences, Bad Homburg
Magellan TM 2.0	Tecan, Männedorf, Schweiz
Microsoft Office365	Microsoft, Redmond, USA
Odyssey Software	Li-COR Biosciences, Bad Homburg
Zen 2009	Zeiss, Oberkochen

4. Methoden

4.1. Zellkultur

Im folgenden Kapitel werden alle Schritte beschrieben, die durchgeführt wurden, um neue Zellen aufzutauen, diese zu kultivieren und anschließend für eine unbefristete Lagerung vorzubereiten. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Um dies zu gewährleisten, wurde unter der Sterilbank mit laminarer Strömung ausschließlich mit Einmalhandschuhen gearbeitet. Die Arbeitsplatte wurde vor Arbeitsbeginn mit 70 % Ethanol desinfiziert. Alle benötigten Medien und Puffer, sowie Pipetten waren ebenfalls steril. Alle Zelllinien wurden in einen Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ aufbewahrt, um ein optimales und gleichmäßiges Wachstum zu gewährleisten.

Sowohl die humanen als auch die murinen Pankreaskarzinomzellen wurden nach 12 Passagen verworfen, um vergleichbare Ergebnisse aus unabhängigen Wiederholungen gewährleisten zu können.

4.1.1. Auftauen von Zellen

Dieser Prozess sollte in einem möglichst kurzen Zeitraum durchgeführt werden, da die Zellen nach dem Auftauen empfindlich sind und schnellstmöglich in das entsprechende Medium überführt werden müssen. Für das Auftauen wurden 5 mL Medium (10 % FCS, 1 % Pen/Strep) in einem 15 mL Reaktionsgefäß (Greiner) vorgelegt und im Inkubator vorgewärmt. Von diesem Medium wurden 1 mL entnommen, zu den noch gefrorenen Zellen gegeben und diese darin verdünnt. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis alle Zellen aufgetaut waren. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 Minuten (min) bei 1300 *revolutions per minute* (rpm) bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in frischem Medium aufgenommen, die Zellen gut damit vermischt und in eine 5 mL sterile Zellkulturflasche überführt. Bevor die frisch aufgetauten Zellen für Experimente genutzt wurden, wurden diese mindestens einmal umgesetzt.

4.1.2. Erhaltungskultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in sterilen Zellkulturflaschen. Alle adhärenenten Pankreaskarzinomzellen wurden in DMEM Medium, mit 4500 mg/L Glukose, L-Glutamin, 10 % FCS und 1 % Penicillin und Streptomycin (Pen/Strep) kultiviert. Es wurde gewartet, bis der Zellrasen zu 80 % konfluent war, um die Zellen umzusetzen oder für Experimente auszusäen. Alle Suspensionszellen (Leukämiezellen) wurden in RPMI Medium, mit 4500 mg/L Glukose, L-Glutamin und 1 % Pen/Strep kultiviert. Abhängig von der Zelllinie wurde an FCS-Konzentration variiert.

Die Zelldichte wurde mittels Lichtmikroskops ermittelt. Eine regelmäßige Umsetzung der Zellen war essenziell, da der enge Zell-Zell-Kontakt zum Wachstumsstopp führen und die Proliferation somit verlangsamen kann. Durch das regelmäßige Wechsel des Kulturmediums konnte ein Nährstoffmangel vorgebeugt werden. Der Vorgang des Passagierens wurde zwei Mal pro Woche durchgeführt, wobei die Zellen in einem Verhältnis von 1:10 umgesetzt wurden.

Das Medium wurde abgenommen und der Zellrasen einmal mit einigen Millilitern *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden, je nach Größe der Flasche, 1-3 mL 1x Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) [404] verwendet und im Inkubator bei 37 °C für 5-10 min inkubiert, um den die optimale Wirkungstemperatur von Trypsin zu erreichen und den Vorgang des Ablösens zu beschleunigen. Trypsin ist ein Verdauungsenzym, welches Proteine und Peptiden, darunter auch Adhäsionsproteinen, hydrolytisch spaltet. Durch den Chelatbildner EDTA werden Calcium und Magnesium gebunden, wodurch Zell-Zell-Kontakte zusätzlich geschwächt werden [405]. Das vollständige Ablösen der Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop überprüft. Um die Wirkung von Trypsin/EDTA zu stoppen, wurden 7-9 mL Medium zur Zellsuspension hinzugegeben und gut vermischt. Durch das Mischen werden Zellklumpen vereinzelt. Je nach Konfluenzgrad wurde eine bestimmte Menge der Zellsuspension in die Zellkulturflasche überführt und mit frischem Medium aufgefüllt. Die Flasche wurde mehrmals geschwenkt, um die eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf dem Flaschenboden zu gewährleisten. Der Rest der Zellsuspension wurde entweder verworfen, oder für die Aussaat von weiteren Experimenten verwertet.

Um Suspensionszellen umzusetzen, wurde eine bestimmte Menge aus der Zellkulturflasche entnommen, welche für eine Aussaat verwendet oder verworfen wurde. Die zurückgebliebene Zellsuspension wurde anschließend mit frischem Medium aufgefüllt.

4.1.3. Kryokonservierung

Zellen können tiefgefroren und für einen späteren Zeitraum konserviert werden, wenn diese nicht mehr für Experimente benötigt werden. Für den Prozess der Kryokonservierung wurden ausschließlichen Zellen genommen, die noch keine drei Male nach dem Auftauen umgesetzt worden sind. Hierbei werden die Zellen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert, wodurch theoretisch eine unbefristete Lagerung gewährleistet wird. Das Ablösen von Zellen wurde, wie in **Kapitel 4.1.2.** beschrieben, durchgeführt. Die somit erhaltene Zellsuspension in einem Zentrifugenröhrchen wurde bei 1300 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet in dem Einfriermedium vermischt. Das Einfriermedium besteht aus FCS, welches mit 10 % der Gefrierschutzsubstanz DMSO zugesetzt ist. Je nach Größe des Pellets variiert die Menge des Einfriermediums. Pro Kryogefäß wurden 1 mL Zellsuspension überführt. Für einen schonenden Einfrierprozess wurden die Kryoröhrchen in mit Isopropanol gefüllten Einfrierhilfen gelegt und für eine Woche bei -80 °C gelagert. Danach konnten die Kryogefäßen in flüssigen Stickstoff überführt werden.

4.1.4. Zellzahlbestimmung und Aussaat

Wie bereits in Kapitel 4.1.2. beschrieben, ist es wichtig einen passenden Konfluenzgrad zu erzielen, damit Ergebnisse aus unabhängigen Wiederholungen vergleichbar bleiben. Dies ist vor allem bei der Aussaat von Zellen für Experimente essenziell. Daher wurde für jede Aussaat die Zellzahl bestimmt. Dafür wurden die Zellen abgelöst, vereinzelt (s. **Kapitel 4.1.2.**) und in ein Reaktionsgefäß überführt. Aus dieser Zellsuspension wurden 10 μL abgenommen, auf eine Zählkammer aufgetragen und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Es wurde eine Neubauer-Zählkammer für die Bestimmung der Zellzahl verwendet. Dieses weist vier große Quadranten auf, welche selbst nochmal in 16 weitere Quadranten aufgeteilt sind.

Der Mittelwert \bar{x} aus den vier großen Quadranten wurde bestimmt und die Zellzahl nach Gleichung (1) ermittelt:

$$\bar{x} \cdot 10^4 = \frac{\text{Zellen}}{\text{mL}} \quad (1)$$

Je nach Größe des Experiments wurde eine bestimmte Anzahl an Zellen pro Milliliter ausgesät. Dabei variierte die Größe der Schalen und somit auch das Volumen, welches nötig war, um die Schale vollständig zu bedecken. Die benötigte Menge an Zellsuspension pro Experiment wird wie in Gleichung (2) dargestellt berechnet. Dabei wird ebenfalls die berechnete Zellzahl aus Gleichung (1) beachtet.

$$\frac{\text{gewünschte Zellzahl}}{\text{berechnete Zellzahl}} = \text{benötigtes Volumen der Zellsuspension [mL]} \quad (2)$$

Das errechnete Volumen konnte entnommen und mit einer bestimmten Menge an Medium aufgefüllt und in die Platten verteilt werden.

Aus **Tabelle 13** können alle Volumina und die ausgesäten Zellzahlen für die jeweiligen Versuchsplatten entnommen werden.

Tabelle 13: Verwendete Schalengröße, Volumina und die dazugehörige ausgesäte Zellzahl.

Schalengröße	Volumen [mL]	Ausgesäte Zellzahl/well		
		24 h	48 h	72 h
12-well Platte	2	$2,00 \cdot 10^5$	$1,00 \cdot 10^5$	$0,50 \cdot 10^5$
6-well Platte	3	$3,50 \cdot 10^5$	$1,75 \cdot 10^5$	$9,00 \cdot 10^5$
6 cm Schale	5	$1,00 \cdot 10^6$	$5,00 \cdot 10^5$	–
10 cm Schale	10	$3,00 \cdot 10^6$	–	–

Für die Durchflusszytometrie und die Immunfluoreszenz wurden 6-well-Platten, für Western Blot- und Proteomanalysen 6 cm- oder 10 cm-Schalen verwendet.

4. Methoden

4.1.5. Behandlung

Zwischen der Aussaat und der Behandlung der Zellen lagen meistens 24 h, jedoch mindestens 16 h dazwischen, um den Zellen die Zeit zu geben sich zu adaptieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit verschiedenen Inhibitoren gearbeitet, die in unterschiedlichen Stock-Konzentrationen und in verschiedenen Lösungsmitteln vorlagen (**Tabelle 14**).

Tabelle 14: Verwendete Inhibitoren, ihre Stammkonzentration und Lösungsmitteln.

Inhibitor	Stammkonzentration [mM]	Lösungsmittel
PD	10	EtOH
HU	100	PBS
MS-275	5	DMSO
MK-1775	1	DMSO
Z-VAD-FMK	50	DMSO
JG-98	10	DMSO
IT	10	Wasser
KU-60019	10	DMSO
Chloroquin	60	Wasser
Lactacystin	10	DMSO

HU wurde vor jeder Anwendung neu angesetzt und nach höchstens 30 min verworfen. Dafür wurden 0,0076 g HU in 1 mL PBS gelöst. Alle anderen Inhibitoren wurden einmal angesetzt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Abhängig von der Versuchsreihe und der Volumina der Versuchsplatten wurde die benötigte Menge an Inhibitor berechnet und den Zellen anschließend verabreicht. Um Pipettierfehler zu vermeiden, wurden für Volumina unter 2 µL eine Verdünnung von 1:10 oder 1:100 angesetzt. Die Zellen standen danach für 24 h, 48 h oder 72 h im Inkubator. Es erfolgte kein zusätzlicher Mediumwechsel bei langen Zeitwerten.

4.1.6. Transiente Transfektion

Um die Auswirkungen von Funktionsverlustmutationen in einzelnen Genen zu untersuchen, kann die Expression bestimmter Gene spezifisch gehemmt werden. Dieser Prozess wird als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet. Hierfür wird eine fremde doppelsträngige RNA in die Zelle eingebracht, welches um die 21-23 Basenpaare (bp) lang ist [406-408]. Diese wird *small interfering RNA* (siRNA) genannt.

Durch die Transfektion der siRNA in die Zelle werden gezielt einzelne Gene posttranskriptiv auf mRNA-Ebene unterdrückt und die Expression des untersuchten Proteins verhindert [409]. Dieser Vorgang ist transient und wird als ein *knockdown* dieses Gens bezeichnet. Diese Arbeit legt den Fokus auf das Protein PR130, wodurch die Unterdrückung der *PPP2R3A* Expression von bedeutendem Interesse ist.

Bei adhärennten Zellen erfolgte die Transfektion mit dem Lipofectamine® RNAiMAX Reagenz. Die Aussaat erfolgte auf 6-well Platten mit $1,50 \cdot 10^5$ Zellen pro well. Für die Transfektion wurden verschiedene Mastermixe hergestellt (**Tabelle 15**). Die Mengenangaben wurden jeweils für ein *well* berechnet.

Tabelle 15: Auflistung der Mastermixe für eine Transfektion mit siRNA.

	siPPP2R3A	Kontroll-siRNA	Lipofectamine® RNAiMAX Reagenz	Opti-MEM®
Mastermix 1	-	3 µL (30 pmol)	-	100 µL
Mastermix 2	3 µL (30 pmol)	-	-	100 µL
Mastermix 3	-	-	5 µL	100 µL

Die eine Hälfte vom Mastermix 3 wurde zum Mastermix 1 gegeben, während die andere Hälfte in den Mastermix 2 überführt wurde. Anschließend wurden die Mastermixe für 10 min bei RT inkubiert. Nach den 10 min wurden jeweils 200 µL des Transfektionsgemisches tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde dieser Vorgang wiederholt, um einen vollständigen *knockdown* zu erreichen. Nach insgesamt 48 h wurden die Zellen mit PD behandelt. Der *knockdown* wurde im Western Blot überprüft.

4. Methoden

4.1.7. Stabile Transfektion (CRISPR-Cas9) [410]

Eine weitere Möglichkeit ein Gen gezielt auszuschalten oder zu modifizieren, erfolgt über die gentechnische Methode des *clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated 9* (CRISPR-Cas9). Das Gen wird auf der DNA-Ebene „angegriffen“, wobei die Veränderungen permanent bleiben. Man spricht in diesem Fall von einem *knock-out* des Gens. Das Protein Cas9 ist eine Nuklease, welches als Schneidemolekül der DNA fungieren soll. Um spezifisch an einer DNA-Sequenz zu schneiden, wird eine *single guide* RNA (sgRNA) benötigt, welche komplementär zum Abschnitt der Ziel-DNA ist. Im Prinzip wird bei dieser Methode ein Doppelstrangbruch durch die Cas9-Nuklease generiert, wodurch Reparaturmechanismen aktiviert werden. Während der Reparatur der DNA durch HR oder NHEJ, werden die gewünschten Modifikationen eingebaut [410-413]. Die verwendete Cas9-Nuklease war an *green fluorescent protein* (GFP) gekoppelt.

Bei adhärennten Zellen konnten die besten Ergebnisse mit dem Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Cas9 Transfektionsreagenz erzielt werden. Für diese Experimentreihe wurden $1,00 \cdot 10^5$ Zellen auf 6-*well* Platten ausgesät. Für die Transfektion wurden Mastermixe hergestellt, dessen Zusammensetzungen aus der folgenden Tabelle entnommen werden können (**Tabelle 16**).

Tabelle 16: Mastermixe für CRISPR-Cas9 Transfektionen.

	Opti-MEM® Medium	Cas9- Nuklease	sgRNA	Cas9 Plus™ Reagenz	CRISPRMAX™
Mastermix 1	125 µL	6250 ng	1200 ng	12,5 µL	-
Mastermix 2	125 µL	-	-	-	7,5 µL

Das Cas9 Plus™ Reagenz wurde immer zuletzt zu Mastermix 1 zugegeben. Damit das im Opti-MEM® Medium gelöste CRISPRMAX™ Reagenz nicht länger als drei Minuten stehen gelassen wurde, wurden die zwei Mastermixe vereinigt und für 5-10 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden pro *well* 250 µL des Transfektionskomplexes zu den Zellen getropft. Nach 24 h im Inkubator bei 37 °C wurde dieser Prozess wiederholt.

Nach 48 h wurden die Zellen steril geerntet und für die durchflusszytometrische Einzelzell-Sortierung vorbereitet. Durch die Kopplung mit GFP werden von dem Durchflusszytometer nur Zellen verwertet, die Cas9 aufgenommen haben, was eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Transfektion ist. Somit werden einzelne Zellen, sogenannte *single clones*, in eine 96-well Platte transferiert, welche zuvor mit jeweils 200 μL Medium, 20 % FCS und 1 % Pen/Strep pro well vorbereitet wurden (s. **Abb. 16**).

Diese werden im Inkubator für 2-3 Wochen inkubiert, sodass aus einer einzelnen Zelle eine Zellpopulation anwachsen kann. Ob das Zielgen erfolgreich ausgeschaltet war, wurde im Immunoblot überprüft. Dafür wurden alle Einzelklone gepickt und untersucht.

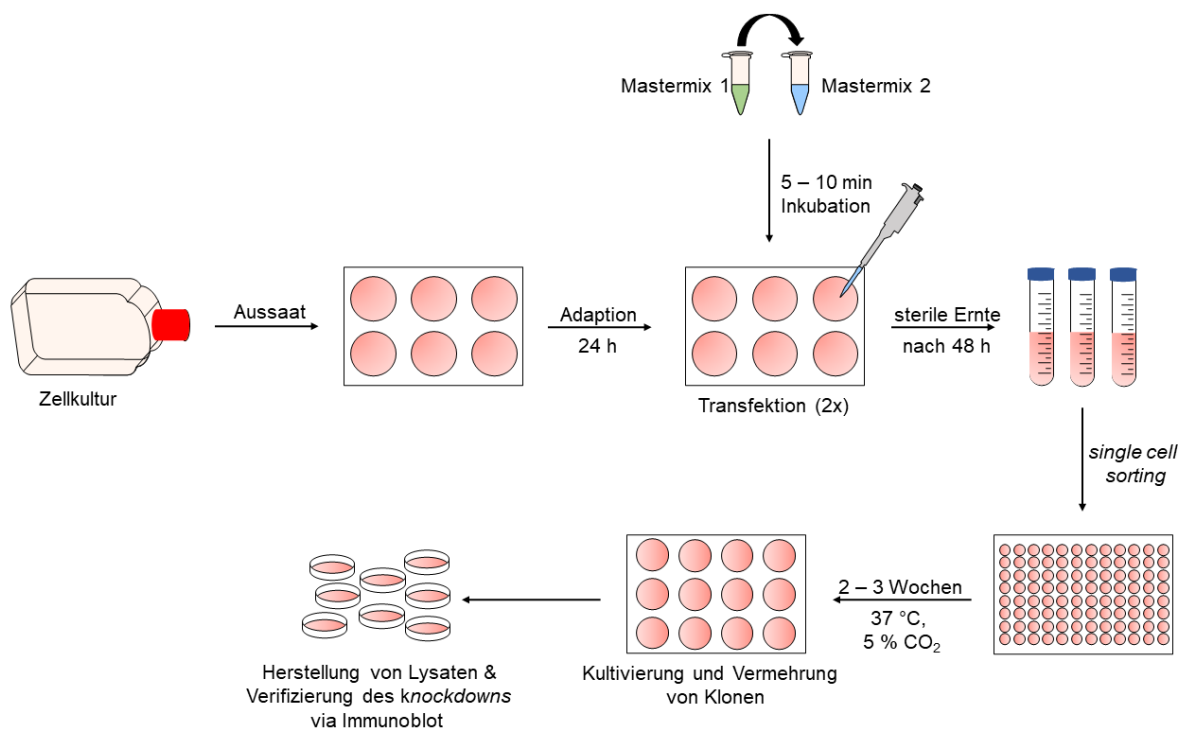


Abbildung 16: Schematische Darstellung für eine stabile Transfektion nach dem CRISPR-Cas9 Verfahren.

4.2. Durchflusszytometrische Analysen

In vielen Bereichen der Forschung, wie zum Beispiel der Molekularbiologie, Immunologie oder Krebsbiologie, wird die Technologie der *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) genutzt, um einzelne Zellen in Lösung zu analysieren. Dabei werden Zellpopulationen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die durch den Laser des Durchflusszytometers angeregt werden und Fluoreszenz emittieren. Diese Signale werden von Photodioden oder Photomultipliern aufgefangen und in elektronische Signale umgewandelt [414].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle durchflusszytometrische Analysen am FACS Canto II (BD) durchgeführt.

4.2.1. Zellvitalitätsanalyse mittels Annexin/PI-Doppelfärbung

Der erste Schritt die Toxizität einer Substanz in Zellen zu ermitteln, ist die Messung des Zelltods nach Behandlung der Zellen mit dieser Substanz. Eine hoch sensitive Methode für die Bestimmung der Apoptoserate ist eine Doppelfärbung mit Annexin-V und Propidiumiodid (PI) [415]. Bei dieser Methode wird zwischen lebenden Zellen (Annexin-V, PI negativ), früh apoptotischen (Annexin-V positiv, PI negativ) und spät apoptotischen/nekrotischen Zellen (Annexin-V, PI positiv) unterschieden.

Die Bindung von Annexin-V an die Plasmamembran zeigt den Zustand ihrer Integrität und Permeabilität. PI interkaliert in die DNA und wird somit häufig zur Färbung des Zellkerns verwendet. Annexin-V hat eine hohe Bindungsaffinität zu dem Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS). Dieses ist in der Zellmembran lokalisiert und flippt während der Apoptose von innen nach außen. Der bei dem Assay verwendete Annexin-V-Bindepuffer enthält Ca^{2+} -Ionen, welche die Bindung zwischen Annexin-V und PS verstärkt [416, 417]. Zellen, die sich in der späten Apoptose befinden oder nekrotisch sind, weisen sowohl eine Annexin-V- als auch eine PI-positive Färbung auf, da hier die Integrität der Plasma- und Kernmembran abnimmt, sodass PI in die Zelle eindringt, in die DNA interkalieren und Fluoreszenz im Durchflusszytometer emittieren kann. Bei lebenden Zellen und Zellen in der frühen Apoptose kann PI die Zellmembran nicht passieren und gibt somit kein Signal.

Das verwendete Annexin-V war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein Isothiocyanat (FITC) gekoppelt.

Bei stark autofluoreszierenden Substanzen, die die Signale im FITC Kanal überlagerten, war das Annexin-V mit dem Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin (APC) gekoppelt.

Die Zellen wurden, wie in **Kapitel 4.1.4.** und **Kapitel 4.1.5.** beschrieben, ausgesät und behandelt. Die Ernte erfolgte direkt in FACS-Röhrchen. Dabei war es wichtig, den Überstand ebenfalls mitzunehmen, da sterbende Zellen sich ablösen und im Medium verweilen. Die Proben wurden für 5 min bei 1300 rpm und RT zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet mit einmal mit 1 mL PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Sowohl Annexin-V als auch PI wurden in 1x Annexin-V-Bindepuffer gelöst. Pro Probe wurden 2,5 µL Annexin-V und 50 µL 1x Bindepuffer verwendet. Für den PI Mastermix wurden 10 µL PI (50 µg/µL) und 430 µL 1x Bindepuffer pro Probe angesetzt. Die Zellen wurden zuerst mit Annexin-V für 20 min bei RT unter Lichtausschluss gefärbt. Kurz vor der Messung erfolgte die Färbung mit PI. Die Messung am FACS Canto II wurde direkt im Anschluss durchgeführt.

4.2.2. Zellzyklusanalyse und SubG1 Bestimmung

Der Zellzyklus ist ein komplexer Vorgang und läuft in verschiedenen Zellzyklusphasen ab. Der DNA-Gehalt der Zelle unterscheidet sich abhängig davon, in welcher Phase die Zelle sich befindet. Diese Unterschiede können durch Zugabe von PI im FACS gemessen werden, wobei die PI-Fluoreszenz in einer Zelle direkt proportional zum DNA-Gehalt dieser Zelle ist.

Die geringste Fluoreszenzintensität wird in der SubG1-Phase erfasst, die den Bereich der abgestorbenen Zellen umfasst, deren DNA bereits fragmentiert ist. In diesem Stadium kann das PI nicht mehr binden, was zu einer Abschwächung des Signals führt [418].

Als nächstes kommen Zellen, die sich in der G0/G1-Phase befinden. Diese Zellzyklusphase wird auch als postmitotische Phase bezeichnet. Hier liegt eine diploide Zelle mit je einem Chromatid pro Chromosom vor ($2n1C$). In der S-Phase findet die DNA-Replikation statt, was dazu führt, dass diese Phase als nächstes im Histogramm in der Durchflusszytometriemessung kommt. Die Phase mit dem höchsten DNA-Gehalt und somit auch der höchsten Fluoreszenzintensität ist die G2/M-Phase.

Hier liegt der vollständige diploide Zwei-Chromatid-Chromosomensatz ($2n4C$) vor [418]. In der $4N$ Fraktion befinden sich Zellen, die mehr als zwei Sätze an Chromosomen besitzen. Diese werden als polypleide Zellen bezeichnet [419].

Die Ernte erfolgte analog, wie in **Kapitel 4.2.1.** beschrieben. Nach dem Waschen mit $1x$ PBS wurde das Pellet in $150-200 \mu\text{L}$ $1x$ PBS vermischt und mit 2 mL eiskaltem 80% EtOH fixiert. Für die vollständige Permeabilisierung wurden die Proben für mindestens 4 h , jedoch höchstens für eine Woche bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Bei der Zellzyklusanalyse handelt es sich um keine Lebendzellfärbung, da die Zellen zuvor mit EtOH fixiert wurden. Der Vorteil hiervon ist, dass die Messung nicht am selben Tag stattfinden muss, sondern auf einen späteren Zeitpunkt verschoben werden kann.

Am Tag der Messung wurden die Proben für 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Pellets einmal mit $1x$ PBS gewaschen. Anschließend wurden die Pellets in $333 \mu\text{L}$ $1x$ PBS und $1 \mu\text{L}$ RNase A (10 mg/mL) vermischt und bei RT für 1 h inkubiert. Kurz vor der Messung wurden den Proben $165 \mu\text{L}$ PI ($50 \mu\text{g/mL}$) zugesetzt. Ab diesem Schritt wurden die Proben lichtgeschützt und gekühlt behandelt. Die Messung am FACS Canto II erfolgte direkt nach der Färbung.

4.2.3. Färbung und Detektion von Aggresomen

Der Begriff Aggresom beschreibt eine Anhäufung von Proteinaggregaten einer Zelle [420]. Proteinaggregate sind zytotoxisch und entstehen, wenn die Synthese und Stabilität von Proteinen beeinträchtigt sind [327, 421]. Um diese Aggregate aufzulösen sind verschiedene Mechanismen des Proteinabbaus beteiligt, wie das UPS [422], Autophagie [423] und HSPs. Diese sind auch für die ordnungsgemäße (Neu-)Faltung von Proteinen zuständig. Um aggregierte Proteine in Zellen nachzuweisen, wurde im Rahmen dieser Dissertation das Aggresom-Detektionskit (Abcam, ab139486) verwendet.

Die Zellen wurden ausgesät und behandelt (s. **Kapitel 4.1.5.**). Die Ernte erfolgte direkt in FACS-Röhrchen. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in $200 \mu\text{L}$ $1x$ PBS gewaschen und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde das Zellpellet sorgfältig mit $200 \mu\text{L}$ PBS vermischt.

Um die Zellen zu fixieren, wurde die Zellsuspension langsam zu einer 2 mL 4 % Formaldehydlösung (37 % Formalin verdünnt in 1x Assay-Puffer) getropft und anschließend gemischt. Es erfolgte eine Inkubationszeit von 30 min bei RT. Die Proben wurden nun bei 800 x g für 15 min zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Die Pellets wurden in 2 mL PBS vermischt und erneut für 15 min bei 800 x g zentrifugiert. Um die Zellen zu permeabilisieren, wurde ein Gemisch aus 0,5 % Triton X-100 und 3 mM EDTA (pH = 8) in 1x Assay-Puffer vorsichtig zu der Zellsuspension gegeben. Es folgte eine Inkubationszeit für 30 min auf Eis. Die Proben wurden erneut für 15 Minuten bei 800 x g zentrifugiert und anschließend mit 1x PBS gewaschen. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Zellsuspensionen in ein Zellsieb gegeben und zentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte bei 800 x g für 15 min. Um Aggresome im FACS zu detektieren, wurde das Aggresom-Detektionsreagenz in 1x Assay-Puffer (1:5000) frisch angesetzt. Nach dem der Überstand verworfen wurde, wurden die Zellpellets in jeweils 500 µL der Aggresom-Detektionslösung vermischt. Die Proben wurden für weitere 30 min lichtgeschützt bei RT inkubiert. Die Messung erfolgte direkt nach der Inkubationszeit am FACS Canto II.

4.2.4. Isolierung und Färbung der PBMC Populationen

Die PBMCs wurden mit der Biocoll® Trennlösung (Bio & SELL) aus *buffy-coats* (Leukozytenfilm) von vier gesunden Spendern isoliert, welche bereits negativ auf allgemeine Infektionen getestet wurden. Die Zellen wurden mit 0.1 µM, 0.5 µM oder 1 µM PD, 0.1 µM oder 0.5 µM MK-1775 oder in Kombination (PD + MK-1775) 24 h behandelt und zur Bewertung der Apoptose einer Durchflusszytometrie unterzogen. Die Proben wurden auf Abstammungsmarker angefärbt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in Färbepuffer (1x PBS, 2 % FCS, 0.5 mM EDTA) gewaschen und mit humanem FcR-Blockreagenz (Nr. 130-059-901, Miltenyi Biotec) inkubiert, um die Antikörperbindung an Fc-Rezeptoren zu verhindern. Anschließend wurden die Proben mit fluoreszenz-markierten Antikörpern inkubiert (20 min, 4 °C) und mit 1x PBS gewaschen. Es erfolgte im Anschluss die Färbung mit Annexin-V FITC (#640906, BioLegend) für 20 min unter Lichtausschluss, um die frühe Apoptose zu bestimmen. Um die Zellen in der späten Apoptose/Nekrose zu detektieren, wurden 5 min vor der Messung das SYTOX™ AADvanced™ (#S10349; ThermoFisher) den Proben hinzugefügt.

4. Methoden

Die Messungen erfolgten mithilfe des Attune™ NxT Durchflusszytometers (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) und die Analyse sowie die Auswertung der Daten wurde unter Verwendung der Attune NxT-Software (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Die Zellen wurden wie folgt definiert: CD3⁺ als T-Zellen, CD3-CD19⁺ als B-Zellen, CD3-CD19-CD14⁺ als Monozyten, CD3-CD19-CD1c⁺ als dendritische Zellen, CD3-CD19-CD56⁺ als natürliche Killerzellen (NK), CD3-CD14-CD19-CD56-CD11b⁺CD15⁺ als Neutrophile und CD3-CD14-CD19-CD56-CD11b⁺ als PMNs. Die folgenden Antikörper von Thermo Fisher wurden verwendet: CD11b BV510 (#101263), CD1c BV605 (#331538), CD3 BV711 (#344838), CD14 PE (#301850) von BioLegend; CD15 APC (#17-0158-42), CD56 PE-Cy7 (#25-0567-42), CD19 SuperBright436 (#62-0199-42).

Diese Methodik wurde von Frau Yanira Zeyn, im Zuge einer Kooperation mit der AG Grabbe/Bros von der Universitätsmedizin Mainz, durchgeführt.

4.3. Proteinexpressionsanalysen

Um posttranslationale Modifikationen oder die Regulierung von Proteinen auf verschiedenen Behandlungen zu analysieren, kann die Methodik der *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) mit anschließendem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran angewandt werden.

4.3.1. Herstellung von Proteinlysaten

Im ersten Schritt werden Gesamtzellextrakte hergestellt. Dafür wurden die Zellen ausgesät, behandelt und nach 24 h geerntet. Die Ernte erfolgte in 15 mL große Zentrifugenröhrchen (Greiner). Es folgte die Zentrifugation der Proben für 5 min bei 1300 rpm. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 mL 1x PBS vermischt und in 1,5 mL Eppendorf Gefäße überführt. Im nächsten Schritt wurden die Proben für weitere 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die erhaltenen Zellpellets konnten entweder bei -80 °C gelagert oder direkt in Lyse-Puffer aufgenommen werden. Ab diesem Schritt wurden die Proben auf Eis behandelt.

Die Zusammensetzung des dafür benötigten 0,5 % NET-N Lyse-Puffers ist in **Tabelle 4** dargestellt. Abhängig von der benötigten Menge an Lyse-Puffer, wurde ein Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (Sigma) in einem Verhältnis von 1:100 frisch dazugegeben. Je nach Größe des Pellets wurden etwa 80-200 µL Lyse-Puffer verwendet. Nach sorgfältigem Mischen des Pellets mit dem Puffer wurden die Proben bei einer Amplitude von 10 % und einer Power von 40 % für 10 Sekunden sonifiziert. Die Proben wurden für 25 min bei 14800 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand ist das fertige Lysat und wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate können bei -20 °C bis zum Aufbrauchen gelagert werden.

4.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford [424]

Um die gleiche Menge von Proteinen in den verschiedenen Proben zu erhalten, wurde im nächsten Schritt die Proteinmenge quantitativ bestimmt. Bei dieser Methodik handelt es sich um ein photometrisches Verfahren, in dem das Absorptionsmaximum des Farbstoffes *Coomassie Brilliant Blue* sich verschiebt.

Diese Verschiebung beruht auf der Menge an Protein, die in der Probe enthalten ist und sich an den Farbstoff binden kann. Ohne gebundene Proteine liegt das Absorptionsmaximum von *Coomassie Brilliant Blue* bei 465 nm. Werden Proteine gebunden, verschiebt sich dieses auf 595 nm [425]. Ein optischer Unterschied kann ebenfalls wahrgenommen werden. Je mehr Protein in der Probe enthalten ist, desto blauer wird die Lösung. Die Menge des blauen Farbstoffs ist hierbei direkt proportional zur Proteinmenge. Mithilfe einer Standardgerade mit bekannten Konzentrationen kann der Proteingehalt der Proben berechnet werden. Dafür wurde eine Konzentrationsreihe mit dem Protein *bovine serum albumin* (BSA) verwendet. Die Konzentrationen der Standardgerade kann **Tabelle 17** entnommen werden.

Der Bradford-Assay wurde in eine 96-well-Platte durchgeführt. Dafür wurden die zu analysierenden Proben in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Bei stark konzentrierten Proben wurde eine Verdünnung von 1:20 angewendet. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Je 10 µL einer Probe und einer Probe der Standardgerade wurden nach und nach in die *wells* pipettiert. Die *wells* wurden anschließend mit 200 µL Bradford-Reagenz aufgefüllt und für 5-10 min bei RT unter Lichtabschluss inkubiert.

4. Methoden

Tabelle 17: BSA-Standardgerade für eine Proteinbestimmung nach Bradford.

Konzentration [ug/10 µL]	dest. Wasser [µL]	1 mg/mL BSA [µL]
0	30	0
0,5	28,5	1,5
1	27	3
2	24	6
3	21	9
4	18	12
5	15	15

Die Zusammensetzung des Bradford-Reagenzes kann der **Tabelle 4** entnommen werden. Anschließend wurde die Platte im *Microplate Reader* für 10 Sekunden geschüttelt und die Messung erfolgte bei der Absorptionslänge von 595 nm. Um eine gute Detektion der Proteine zu gewährleisten, wurden 30-40 µg Protein aufgetragen. Für ein einheitliches Pipettiervolumen wurden die Proben anschließend mit dest. Wasser aufgefüllt. Für Kämmen mit zehn Taschen wurde ein Endvolumen von 36 µL kalkuliert und für Kämmen mit 15 Taschen betrug das Endvolumen 30 µL. Die Proben wurden im letzten Schritt noch mit 6x Probenpuffer im Verhältnis von 1:6 des Endvolumens beladen.

4.3.3. SDS-Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse

Mit einer SDS-PAGE werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Dabei ist die Porengröße des Gels, die durch die Acrylamidkonzentration des Gels bestimmt wird, ebenfalls ein entscheidender Faktor. Mit steigender Konzentration nimmt die Größe der Poren ab. In diesem Fall werden kleine Proteine in der unteren Hälfte des Gels gut aufgetrennt, während große Proteine sich im oberen Teil des Gels befinden [426-428].

Für die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld, wurden diese denaturiert. Dafür wurden die Proben aus **Kapitel 4.3.2.** für 5 min bei 95 °C und 800 U/min erhitzt. Das im 6x Probenpuffer enthaltene SDS ist ein anionisches Detergens, welches sich an die denaturierten Proteine anlagert und die Eigenladung der Proteine überlagert. Dadurch entsteht ein negativ geladener Proteinkomplex, das sich im angelegten elektrischen

Feld zur Anode bewegt. Größere Proteine bewegen sich dabei langsamer als Proteine mit einem geringeren Molekulargewicht.

Die Polyacrylamid-Gele wurden am vorigen Tag vorbereitet, wobei das Gel eine Zweiteilung aufweist. Das Sammelgel besitzt einen niedrigeren pH-Wert und ist großporiger als das Trenngel. Man spricht daher von einer diskontinuierlichen Elektrophorese [429]. Die Zusammensetzungen für die verwendeten Sammel- und Trenngele können aus **Tabelle 18** entnommen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Gele mit einer Dicke von 1,5 mm verwendet.

Tabelle 18: Zusammensetzung der verwendeten Sammel- und Trenngele. Die angegebenen Mengen gelten jeweils für zwei 1 mm Gele.

	Sammelgel	Trenngel		
		7,5 %	10 %	15 %
dest. Wasser	4,4 mL	6,5 mL	5,6 mL	4,2 mL
1 M TRIS (pH 6,8)	0,76 mL	-	-	-
1,5 M TRIS (pH 8,8)	-	3 mL	3 mL	3 mL
Acrylamid	0,76 mL	2,3 mL	3,1 mL	4,6 mL
10 % SDS	60 µL	120 µL	120 µL	120 µL
10 % APS	60 µL	60 µL	60 µL	60 µL
TEMED	6 µL	6 µL	6 µL	6 µL

Das Trenngel wurde zuerst gegossen und anschließend mit einigen Millilitern Isopropanol überschichtet. Sobald das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol abgekippt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Dabei wurden dem Sammelgel entweder Kämmen mit 10 oder 15 Taschen eingesetzt. Nachdem das Sammelgel ebenfalls auspolymerisiert war, wurden die Gele in feuchten Tüchern eingepackt und bei 4 °C bis zum Gebrauch, jedoch höchstens eine Woche, gelagert. Am Tag der Gelelektrophorese wurden die Kämmen gezogen, die Gele in die Apparaturen eingespannt und mit SDS-Elektrophorese-Puffer aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Beladung der Proben. Zusätzlich wurde pro Gel noch 4 µL des Molekulargewichtsmarkerns *PageRuler Prestained Protein Ladder* in eine freie Tasche beladen. Die Gelelektrophorese startete bei 95 V. Sobald die Proben im Sammelgel gesammelt wurden und anfangen in das Trenngel überzulaufen, wurde die Spannung auf 125 V erhöht. Die Gelelektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront das Ende des Gels erreichte.

4. Methoden

Im nächsten Schritt erfolgte die Übertragung der Proteine im Gel durch das Tankblotting im Transferpuffer auf eine Nitrozellulosemembran. Diese wurden im Voraus im Transferpuffer inkubiert. Auch bei dieser Methode wurde ein elektrisches Feld angelegt, sodass die negativ geladenen Proteine zur Anode wandern konnten. Folglich wurde die Membran auf die Seite der Anode angebracht und das Gel auf die Seite der Kathode. Zusätzlich wird dieser Aufbau noch von Whatman-Papier und Schwämmen umhüllt und in eine Blotkassette eingespannt (**Abbildung 17**).

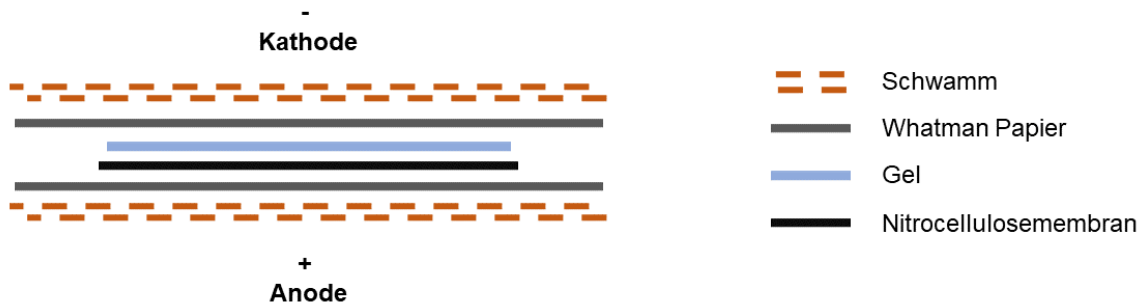


Abbildung 17: Aufbau einer Blotkassette.

Die Schwämme und die Whatman-Papiere wurden ebenfalls im Transferpuffer eingelegt. Es wurde darauf geachtet, dass keine Luft zwischen dem Gel und der Membran war. Es wurde zusätzlich mit einem Kühlakku gekühlt, welches in der Blotkammer platziert wurde. Nachdem die Blotapparatur mit dem Transferpuffer aufgefüllt wurde, wurde eine Stromstärke von 150 mA pro Gel eingestellt. Der Transfer dauerte in der Regel 2,5 h. Die Membran wurde nach der Übertragung einmal für 5 min in 1x TBS-T gewaschen und anschließend in einer Lösung von 5 % Magermilchpulver in 1x TBS-T für 1 h geblockt. Dies ist ein essenzieller Schritt, da diese Methodik auf der spezifischen Antigen-Antikörper-Interaktion basiert [430]. Durch das Inkubieren der Membran in Milchpulver werden unspezifische und proteinfreie Stellen auf der Membran geblockt, sodass störende Hintergrundsignale auf das Minimum reduziert werden können. Die Membran wurde anschließend über Nacht in den jeweiligen Primärantikörpern auf einem Rollschüttler bei 4 °C inkubiert.

4.3.4. Proteindetektion

Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal für 5 min in 1x TBS-T gewaschen. Während des Waschvorgangs, wurden die passenden Sekundärantikörper angesetzt. Die verwendeten Sekundärantikörper waren an einem Infrarot-Farbstoff gekoppelt.

Die Inkubation der Membranen im Sekundärantikörper erfolgte lichtgeschützt für 2 h bei RT. Um Hintergrundsignale durch mögliche Antikörperrückstände zu entfernen, wurden die Membranen erneut dreimal für 5 min in TBS-T gewaschen. Die Proteine wurden zeitnah am Odyssey©-*Infrared Imaging System* detektiert.

4.4. Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz (IF) [431] ist eine mikroskopische Methode, die auf der spezifischen Antigen-Antikörper-Wechselwirkung beruhen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die direkte Immunfluoreszenz durchgeführt. Diese erlaubt die Anfärbung und Visualisierung von Zellstrukturen im Fluoreszenzmikroskop, wie dem Zytoskelett oder Organellstrukturen. Es werden hierbei Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper in die Zelle eingebracht, welche an die Zielstruktur binden.

4.4.1. Vorbereitung der Deckgläser

Für die IF werden besondere 20x20 mm Deckgläser benötigt. Dafür wurden diese zuvor für 20 min in Diethylether im Abzug inkubiert und anschließend für jeweils 5 min mit 100 % EtOH, 70 % EtOH und dest. Wasser gewaschen. Um die Oberfläche anzurauen, wurden die Deckgläser zusätzlich in 1 M HCl für 20 min auf einem Kippschüttler inkubiert. Um HCl Rückstände vollständig zu entfernen, wurden die Deckgläser mit dest. Wasser gewaschen. Anschließend können diese bis zur Verwendung in 70 % EtOH bei 4 °C gelagert werden.

4.4.2. Aussaat und Fixierung der Zellen

Die Zellen wurden zuvor ausgesät, mit bestimmten Konzentrationen behandelt und für eine bestimmte Zeit inkubiert. Dabei erfolgte die Aussaat der Zellen direkt auf die Deckgläser in den 6-well Platten. Um zu gewährleisten, dass keine EtOH Rückstände mehr vorhanden waren, wurden die Platten einmal mit sterilem Medium gespült. Es wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Probe (für 24 h) ausgesät.

Nach dem die Behandlungszeit abgelaufen war, wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen einmal mit 1x PBS für 5 min gewaschen. Für die Fixierung wurde das 1x PBS abgesaugt, die Zellen wurden sofort mit eiskaltem Methanol/Aceton (7:3) überschichtet und exakt für 8 min bei -20 °C inkubiert.

4. Methoden

Nachdem die Methanol/Aceton-Lösung wieder abgesaugt wurde, wurde der Zellrasen anschließend drei Mal mit 1x PBS für jeweils 5 min gewaschen.

4.4.3. Permeabilisierung, Blocken unspezifischer Bindungsstellen und Färbung der Zellen

Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit einer 5 % BSA/PBS-Lösung für 1 h bei RT inkubiert. Dies dient dem Absättigen (Blockieren) unspezifischer Bindestellen. Dafür wurden 150 µL der Blockier-Lösung in kreisförmige Bewegungen auf die Zellen getropft. Das in der Blockier-Lösung enthaltene Triton X-100 dient dazu, die fixierten Zellen für die Antikörper permeabel zu machen. Die genaue Zusammensetzung der Blockier-Lösung kann aus **Tabelle 4** entnommen werden. Für die Färbung der Zellen mit dem Primärantikörper, wurde dieser in einer bestimmten Konzentration in Blockier-Lösung verdünnt. Es wurden pro Probe 180 µL Primärantikörper-Lösung vorsichtig auf die Zellen getropft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Versuchstag wurden die Zellen auf den Glasplatten 3 x 5 min mit 1x PBS gewaschen, um nicht gebundene Primärantikörper zu entfernen. In dieser Zeit wurden die Sekundärantikörper vorbereitet. Da diese lichtempfindlich sind, musste ab diesem Schritt lichtgeschützt gearbeitet werden. Die Sekundärantikörper wurden in einem Verhältnis von 1:300 in Blockier-Lösung angesetzt. Es wurde pro Probe 180 µL Sekundärantikörper-Lösung verwendet. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT unter Lichtausschluss. Anschließend wurden die Glasplatten 2 x 5 min mit 1x PBS gewaschen. Um Hintergrundsignale zu minimieren, erfolgte eine Inkubation mit Hochsalz-PBS für exakt 2 min. Es wurde abschließend für 5 min erneut mit 1x PBS gewaschen. Damit war die Färbung der Proteine abgeschlossen.

4.4.4. Nukleusfärbung und Versiegelung

Um den Zellkern zu visualisieren, wurde dieser mit TO-PRO™-3 (Thermo Fischer) gefärbt. Dafür wurden das TO-PRO™-3 in *Vectashield*® (Biozol) in einem Verhältnis von 1:100 gelöst. Aufgrund der viskosen Eigenschaften des *Vectashields*, war ein sehr gutes Durchmischen dringend erforderlich. Die Objektträger wurden gereinigt und beschriftet. Für jede Probe wurden 10 µL des *Vectashield*-TO-PRO™-3- Gemisches verwendet. Dieses wurde als Tropfen auf den Objektträger angebracht.

Die Deckgläser wurden langsam und vorsichtig mit der Zellseite nach unten auf den Objektträger gelegt. Dabei wurde ein Skalpell zur Hilfe genommen, um die Glasplatte zu stützen. Dieser Schritt wurde unternommen, um mögliche Luftblasen zwischen dem Deckglas und dem Objektträger zu vermeiden. Die Ränder der Deckgläser wurden anschließend mit Klarlack versiegelt. Die Proben wurden entweder direkt im Anschluss am konfokalen Mikroskop LSM710 analysiert oder bis zur Messung bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Die Auswertung erfolgte mit der Software *ImageJ*. Dafür wurden 100-200 Zellen pro Kondition ausgezählt und in die Statistik eingebracht.

4.5. SILAC und Proteomanalyse [432, 433]

Die Proteomanalyse erlaubt einen Einblick in die Gesamtheit der Proteine einer Zelle an einem bestimmten Zeitpunkt zu definierten Bedingungen. Durch die Methodik kann erkannt werden, welches Protein in welcher Menge vorhanden ist und wie dieses unter den gegebenen Bedingungen reguliert wird. Die einzelnen Proteine werden massenspektrometrisch analysiert. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Proteomanalyse dem *Labelling* mittels SILAC (*stable isotope labelling with amino acids in cell culture*) angeschlossen. SILAC wird in der Forschung eingesetzt, um Proteinmengen quantitativ zu bestimmen [434]. Dabei werden die Unterschiede durch den metabolischen Einbau von stabilen, nicht-radioaktiven Aminosäure-Isotopen massenspektrometrisch erfasst.

Für die stabile Isotopenmarkierung wurden die Zellen 2 Wochen (~ 4 Passagen) in *light* Medium (L-Arginin-0, L-Lysin-0) und *heavy* Medium (L-Arginin-10, L-Lysin-8) kultiviert. Nachdem die Zellen wieder ein normales Wachstumsverhalten zeigten, war die Markierung vollendet. Es folgte eine Aussaat und die Behandlung der Zellen. Nach Ablauf der Behandlungszeit wurden alle Zellfraktionen in ein Zentrifugenröhrchen geerntet und bei 1300 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in einigen Millilitern 1x PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert (1300 rpm, 5 min). Anschließend wurden die Zellen abhängig von der Pelletgröße in 100-130 µL NuPAGE® LDS *Sample Buffer* (1x) (Thermo) und 10 % 1M DTT vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert.

4. Methoden

Die Proben wurden im Anschluss für 10 Sekunden sonifiziert (Amplitude 10 %, Power 40 %) und bei 70 °C auf einem Heizschüttler für 10 min erhitzt. Abschließend wurden die Proben für 25 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand ist das fertige Lysat. Diese wurden in frische 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und zur massenspektrometrischen Untersuchung gebracht. Die Messung und die Auswertung der Proben wurde von Dr. Falk Butter am IMB Mainz durchgeführt [435, 436].

Die Rohdaten der massenspektrometrischen Untersuchungen sind auf dem Server ProteomeXchange Consortium, über den Partner PRIDE (*Proteomics Identifications*) mit der Identifikationsnummer PXD044854 [437], zugänglich.

4.6. Statistik

Zur Validierung der erhaltenen Ergebnisse wurden die verschiedenen Versuchsreihen 2-3 Mal wiederholt. Dadurch konnte eine Aussage über eine mögliche statistische Signifikanz getroffen werden. Alle Statistikanalysen wurden mit der Software *GraphPad Prism* Vers.8.3.0 durchgeführt. Je nach Versuchsaufbau wurde zwischen einem *one-way*, *two-way* ANOVA (Varianzanalyse) oder einem ungepaarten t-Test gewählt. Die statistische Signifikanz wird über den p -Wert definiert. Es wird unterschieden zwischen * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ und **** $p < 0.0001$. Alle durchgeführten Statistiken wurden mit der Bonferroni-Korrektur validiert. Die angegebenen Signifikanzen wurden ausnahmslos auf die Kontrolle bezogen. Auftretende Abweichungen sind in den zugehörigen Bildbeschriftungen vermerkt.

5. Ergebnisse

Ein Ziel der hier gezeigten Arbeiten war es, die Rolle von PP2A/PR130 in Pankreaskarzinomzellen biochemisch und molekular zu analysieren. Die pharmakologische Relevanz dieses Proteins sollte anhand von durchflusszytometrischen und Western Blot- Analysen charakterisiert werden. Als Modellsysteme dienten vier murine und in fünf humane PDAC Zelllinien, mit einem speziellen Fokus auf MIA PaCA-2 und S411 und 8296 Zellen.

Darüber hinaus soll die Wirkung des PP2A-Inhibitors PD [216] untersucht werden. Hierzu wurden nicht nur PDAC Zellen, sondern auch Leukämiezellen und normale humane Zellen als Systeme eingesetzt.

5.1. Induktion der DNA-Schadensantwort durch HU und Analyse der biologischen Effekte von MS-275 im murinen PDAC Zellsystem

5.1.1. Analysen des Zellzyklus muriner PDAC Zellen nach Behandlung mit HU und MS-275

Im ersten Schritt wurde untersucht, wie der RNRi HU und der HDACi MS-275 (Entinostat) auf murine PDAC Zelllinien wirken. Dafür wurden die Zelllinien S411, 8248, S821 und 8296 getestet. Jede Zelllinie wurde mit klinisch relevanten Dosen von 1 mM HU und 1 μ M MS-275 behandelt [438, 439]. Es wurde zusätzlich eine Dosis von 5 μ M MS-275 verwendet, um die Wirkung von höheren Entinostat-Dosen zu erfassen. Die Zellen wurden ausgesät und mit den Inhibitor Dosen behandelt (**Abb. 18**). Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und für eine Zellzyklusanalyse vorbereitet. Um den Gehalt der DNA in den Zellen durchflusszytometrisch zu bestimmen, wurden die Zellen mit PI gefärbt.

Nach 24 h kam es bei der Behandlung mit 1 μ M MS-275 in allen vier Zellkulturen zu einer Akkumulation von Zellen in der G2/M-Phase. Dies ging mit einer signifikanten Abnahme von Zellen in der G1-Phase einher. Diese Akkumulation in der G2/M-Phase war nur in den S411 Zellen statistisch signifikant. Diese Effekte traten bei der Behandlung mit 5 μ M MS-275 nicht mehr auf.

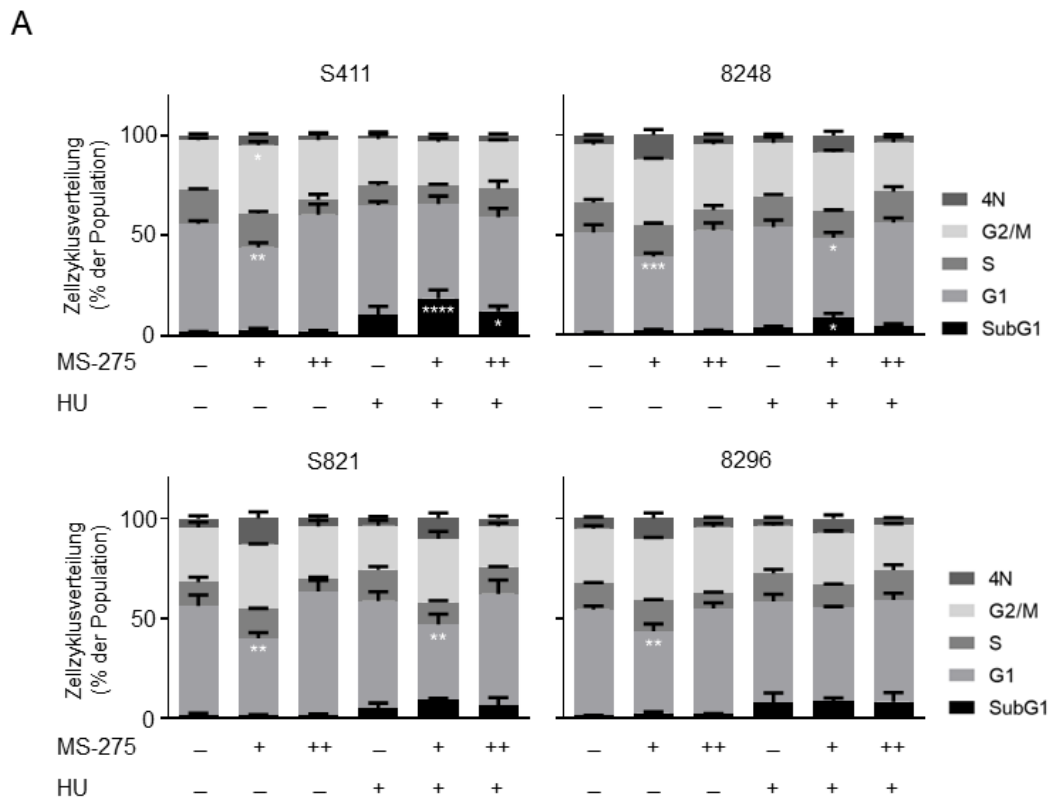


Abbildung 18: Zellzyklusverteilungen von mit HU und MS-275 behandelten murinen PDAC Zellen nach 24 h [440]. (A) Die murinen PDAC Zelllinien S411, 8248, S821 und 8296 wurden 24 h mit 1 μ M Entinostat (+) oder 5 μ M Entinostat (++) und 1 mM HU behandelt. Die Zellen wurden anschließend geerntet und fixiert. Der Zelltod und die Zellzyklusverteilungen wurden mittels FACS Analyse ermittelt; n = 3. Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, ****0,0001).

Die Behandlung mit HU konnte in keiner Zelllinie signifikante Unterschiede im Zellzyklusprofil induzieren. Es wurde lediglich eine tendenzielle Verringerung der G2/M-Phase wahrgenommen. Diese Beobachtungen waren verwunderlich, da durch die Hemmung des RNR ein S-Phasen Arrest erwartet wurde.

In der Kombinationsbehandlung von 1 μ M MS-275 + 1 mM HU nahm die SubG1-Phase signifikant in S411 und 8248 Zellen zu. Eine Kombinationsbehandlung mit 5 μ M MS-275 + 1 mM HU führte jedoch zu einer Abnahme der SubG1-Fraktion in allen vier Zelllinien. Die Kombination HU + 1 μ M MS-275 führte außerdem zu einer tendenziellen Abnahme der G2/M-Phase in S411 Zellen, während in S821 Zellen eine Zunahme dieser Phase auftrat. Die Effekte in der G2/M-Phasenverteilung waren nicht signifikant. Außerdem zeigen die Ergebnisse aus **Abb. 18**, dass eine Kombinationsbehandlung von MS-275 + HU nach 24 h nicht effektiver war als eine HU-Einzelbehandlung.

Die Zelllinien 8248, S821 und 8296 zeigten bei 1 μ M MS eine leichte Zunahme der polyploiden Fraktion (4N). Diese Beobachtung erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

Nach 48 h nahm die SubG1-Fraktion, sowohl in der HU Einzelbehandlung als auch in der Kombination mit 1 μM /5 μM MS-275 in allen vier Zelllinien signifikant zu. Die Kombination von 1 μM MS-275 verringerte signifikant die durch HU bedingte DNA-Fragmentierung in 8248 und 8296 Zellen. Dies konnte jedoch nicht mit 5 μM MS-275 + HU beobachtet werden, da diese Kombination wieder zu einer Zunahme der Zellen in SubG1 zeigte. Dennoch hielten sich die Beobachtungen aus den 24 h Werten, da eine Kombination von MS-275 + HU auch nach 48 h nicht toxischer für die Zellen war als eine HU-Einzelbehandlung.

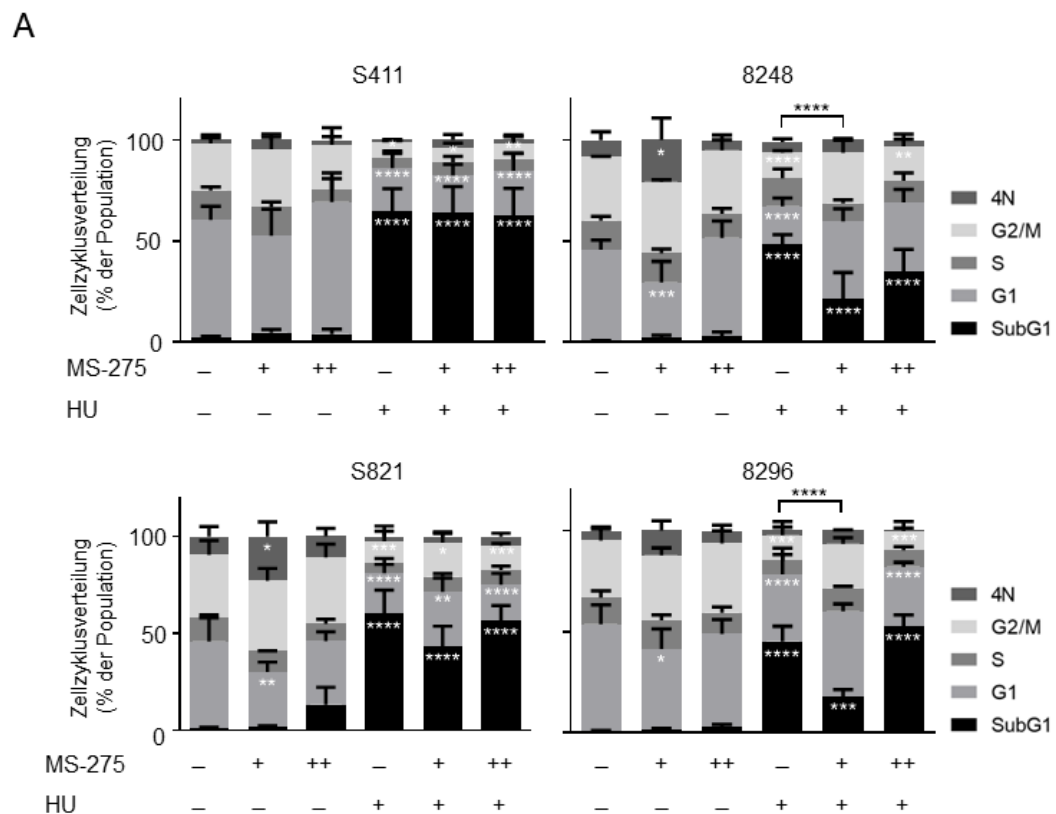


Abbildung 19: Die Behandlung mit HU und MS-275 führt zur Induktion der SubG1-Fraktion nach 48 h [440]. (A) Die murinen PDAC Zelllinien S411, 8248, S821 und 8296 wurden 48 h mit den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Zellzyklusverteilung und die SubG1-Population wurden mittels Durchflusszytometrie an PI-gefärbten Zellen gemessen; $n = 4$. Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Die G1-Phase nahm in 8248, S821 und 8296 mit 1 μM MS-275 signifikant ab, mit 5 μM MS-275 nahm diese in allen vier Zelllinien jedoch wieder zu. Es konnte außerdem eine signifikante Zunahme der polyploiden Fraktion bei 1 μM MS-275 in 8248 und S821 verzeichnet werden.

Die G2/M-Phase konnte mit HU allein oder in Kombination mit 5 μM MS-275 in allen getesteten Zelllinien signifikant reduziert werden. Nur in S821 und S411 Zellen konnten diese Effekte ebenfalls mit 1 μM MS-275 + HU beobachtet werden (**Abb. 19**).

5. Ergebnisse

5.1.2. Zelltodbestimmung nach einer HU und MS-275 Behandlung in murinen PDAC Zellen

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die Anhäufung der Zellen in der SubG1 Phase mit Apoptose verbunden ist. Dafür wurden S411, 8248, S821 und 8296 Zellen für 48 h mit HU und 1 μ M bzw. 5 μ M MS-275 behandelt und mit Annexin-V/PI angefärbt. Es wurde auf eine Analyse nach 24 h verzichtet, da nach diesem Zeitwert die SubG1-Fraktion zu gering ausfiel (s. **Abb. 18**).

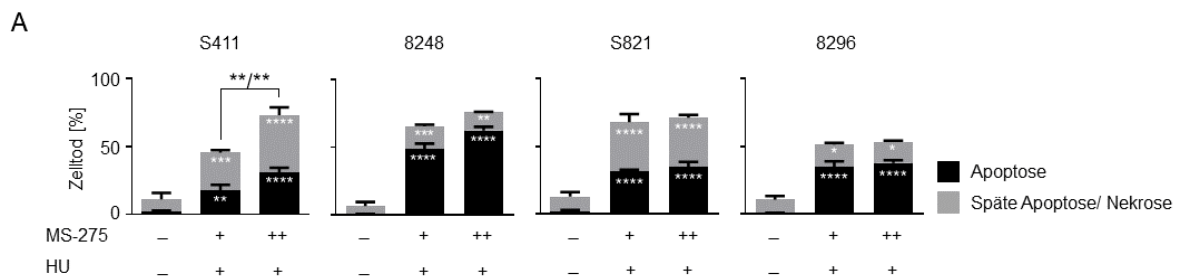


Abbildung 20: **Induktion der Apoptose durch HU und MS-275 [440]. (A)** Die murinen PDAC Zelllinien S411, 8248, S821 und 8296 wurden 48 h mit 1 μ M Entinostat (+) oder 5 μ M Entinostat (++) und 1 mM HU behandelt. Die Zellen wurden anschließend geerntet, mit Annexin/PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert; $n = 3$. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Eine durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass beide Dosen Entinostat in Kombination mit HU Apoptose induzieren. Während 8248 und 8296 Zellen in der frühen Apoptose akkumulierten, befanden sich S411 und S821 Zellen in der späten Apoptose. Lediglich bei S411 Zellen wurde ein bedeutender Unterschied zwischen den verschiedenen Entinostat Konzentrationen festgestellt. Die Kombination von 5 μ M MS-275 + HU führte signifikant zu einer höheren Anzahl von Zellen in der Apoptose im Vergleich zu 1 μ M MS-275. Dieser Unterschied war sowohl in der frühen Apoptose als auch in der späten Apoptose signifikant (**Abb. 20**).

5.1.3. Induktion der DNA-Schadensantwort durch die Behandlung der PDAC Zellen mit HU und MS-275

Im nächsten Schritt wurden die Zelllinien S411, 8248, S821 und 8296 auf DNA-Replikationsstress und auf eine Induktion der DNA-Schadensantwort überprüft. Dafür wurden alle Zellen mit 1 mM HU und 1 μ M oder 5 μ M MS-275 behandelt und für weitere 24 h inkubiert. Die getesteten PDAC Zelllinien zeigten eine Akkumulation des Replikationsstress-/DNA-Schadensmarkers γ -H2AX in HU-behandelten Zellen. Es konnte hier erneut gezeigt werden, dass der Effekt von HU nicht durch Entinostat verstärkt wird. Dieses Ergebnis konnte bereits in den FACS Analysen in **Abb. 18** und **Abb. 19** gezeigt werden.

Das Protein RRM2, welches eine Untereinheit der RNR ist, wird durch HU inhibiert und akkumuliert in den Zellen [200, 202]. Dies konnte in allen vier Zelllinien gezeigt werden. Die Behandlung mit 1 μ M MS-275 löste keine Veränderung in 8248, S821, 8296 Zellen im Vergleich zur Kontrolle aus. Im Gegensatz dazu führte in S411 Zellen die Behandlung mit 1 μ M MS-275 zu einer Abnahme von RRM2. Mit 5 μ M MS-275 war RRM2 in allen vier Zelllinien reduziert. Die Kombination von HU + 1 μ M MS-275 führte wieder einer Zunahme von RRM2, während die Kombination von HU + 5 μ M MS-275 wiederum zu einer Abnahme von RRM2 in allen Zelllinien führte.

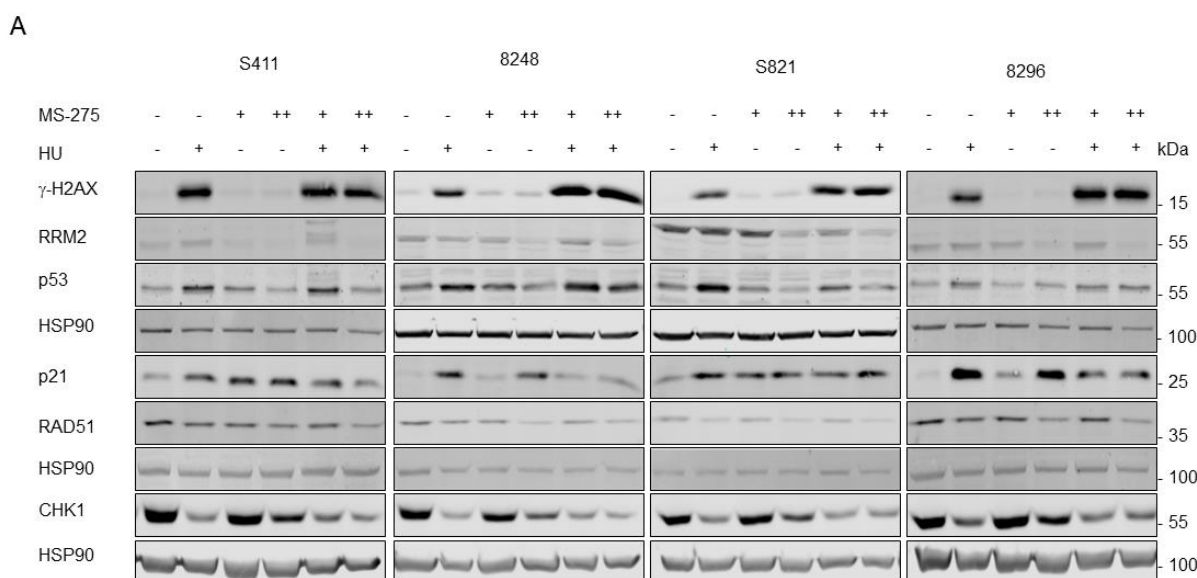


Abbildung 21: Nachweis der Proteinexpression und posttranslationaler Modifikationen als Reaktion auf eine Behandlung mit HU und MS-275 im PDAC Zellsystem [440]. (A) Die murinen PDAC Zelllinien S411, 8248, S821 und 8296 wurden 24 h mit 1 μ M Entinostat (+) oder 5 μ M Entinostat (++) und 1 mM HU behandelt. Immunoblots wurden durchgeführt, um die gezeigten Proteine zu detektieren. HSP90 diente als Ladekontrolle; n = 2.

HU induzierte ebenfalls erfolgreich p53 und sein direktes Zielprotein p21 im getesteten PDAC Zellsystem. Sowohl die Einzel- als auch die Kombinationsbehandlung von HU und Entinostat reduzierten RAD51, welches ein Protein der HR ist [191]. Dieser Effekt war in der Kombinationsbehandlung mit 1 mM HU + 5 μ M Entinostat am stärksten ausgeprägt.

Die Checkpoint Kinase CHK1 war in den Einzelbehandlungen mit HU oder 5 μ M MS-275 in allen Zellen ausnahmslos reduziert. Im Gegensatz dazu blieb der Spiegel an CHK1 in allen Zelllinien bei der niedrigeren Dosis von 1 μ M MS-275 vergleichbar zur Kontrollprobe. Die Kombinationsbehandlungen HU + 1 μ M bzw. 5 μ M MS-275 führte in allen Zelllinien zu einer Reduktion von CHK1 (**Abb. 21**).

Die Auswertungen der **Abb. 18 – 21** zeigen, dass HU eine Reaktion im DNA-Schadensmechanismus induziert, die durch Entinostat zusätzlich beeinflusst wird.

5.1.4. Entinostat schwächt die Effekte von HU in murinen PDAC Zellen ab

Vorangegangene Forschungsergebnisse aus der Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass die PP2A-Untereinheit PR130 in HU-behandelten HCT116 Zellen p-ATM Ser1981 in einem Enzymkomplex bindet und dephosphoryliert [86]. Da die Detektion von p-ATM in den murinen PDAC Zelllinien sich als schwierig erwies und keine konstanten Ergebnisse lieferten, wurde stattdessen p-KAP1 detektiert, welches ebenfalls direkt von ATM gesteuert wird [441].

In allen vier Zelllinien führte die Behandlung von HU zu einer erfolgreichen Induktion von p-KAP1. Die Induktion von p-KAP1 konnte durch die Zugabe von MS-275 in mit HU behandelten Zellen reduziert werden. Die Behandlung mit HU führte zu einer Reduktion von PR130, während Entinostat zu einer Akkumulation dieses Proteins führte. Die Akkumulation von PR130 konnte sowohl in der MS-275 Einzelbehandlung als auch in Kombination mit HU nachgewiesen werden (**Abb. 22**).

A

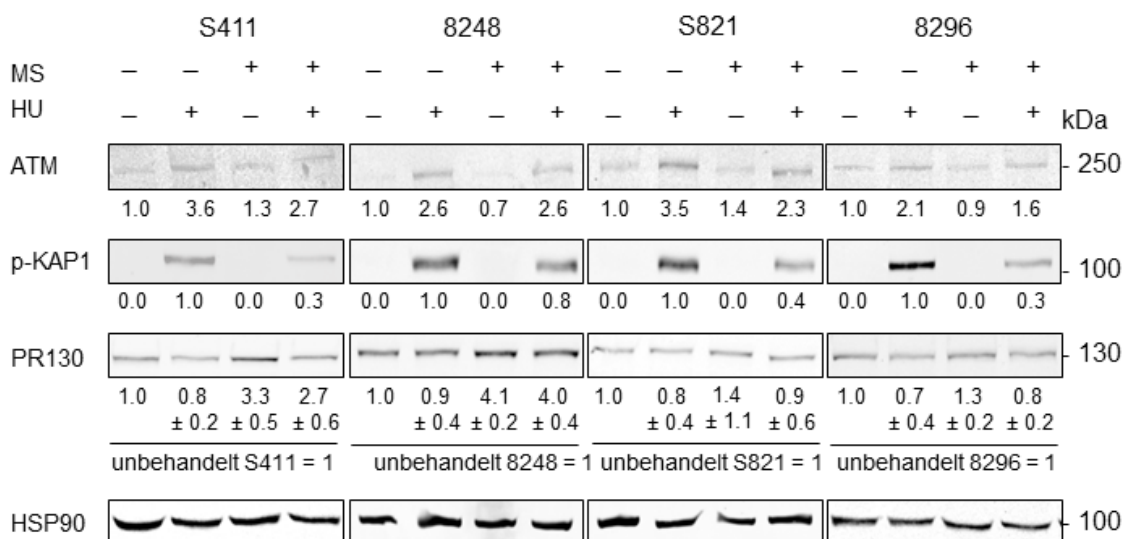


Abbildung 22: **Die Effekte von HU werden in der Kombinationstherapie mit MS-275 vermindert [440].** (A) Die Zelllinien S411, 8248, S821 und 8296 wurden 24 h mit 5 μ M Entinostat und 1 mM HU behandelt. Immunoblots wurden durchgeführt, um ATM, p-KAP1 und PR130 zu detektieren. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Ladung wurde HSP90 detektiert; n = 3.

5.1.5. ATM ist pro-apoptotisch in mit HU-behandelten PDAC Zellen

Die Ergebnisse aus den **Abb. 19** und **Abb. 22** zeigten, dass MS-275 die HU bedingte DNA-Fragmentierung nach 48 h abschwächt. Daher lag die Vermutung nahe, dass ATM die behandelten Zellen vor den zytotoxischen Wirkungen von HU schützt. Um diese Hypothese zu testen, wurden S411, 8248, S821 und 8296 Zellen mit dem spezifischen ATM-Inhibitor KU-60019 und dem RNRi HU behandelt [442].

Nach 24 h führte weder die alleinige Behandlung mit HU noch mit und KU-60019 oder deren Kombination zur Apoptose (**Anhang 1A**). Auch in der Zellzyklusanalyse und der Bestimmung der SubG1-Fraktion wurde nach 24 h bei keiner Bedingung statistisch relevante Unterschiede festgestellt (**Anhang 1B**). Nach 48 h zeigte KU-60019 in der Einzelbehandlung keine nennenswerten Effekte, sowohl in der Zelltodbestimmung (**Abb. 23A**) als auch in der Zellzyklusanalyse (**Abb. 23B**). Die Behandlung mit HU führte in allen Zelllinien, wie erwartet, zu einer DNA-Fragmentierung (**Abb. 23B**), welche mit einer Induktion der Apoptose einherging (**Abb. 23A**). Sowohl die Zellzykluseffekte als auch die Zelltodraten, wurden jedoch durch die Kombinationsbehandlung von HU + KU-60019 wieder abgeschwächt (**Abb. 23A, B**). Diese Beobachtung erreichte in allen Zelllinien eine statistische Signifikanz.

5. Ergebnisse

Diese Daten bestätigen die Hypothese, dass ATM in HU-behandelten PDAC Zellen eine pro-apoptotische Rolle übernimmt, wobei vor allem die Zellen in der G1- und der G2/M-Phase davon betroffen sind.

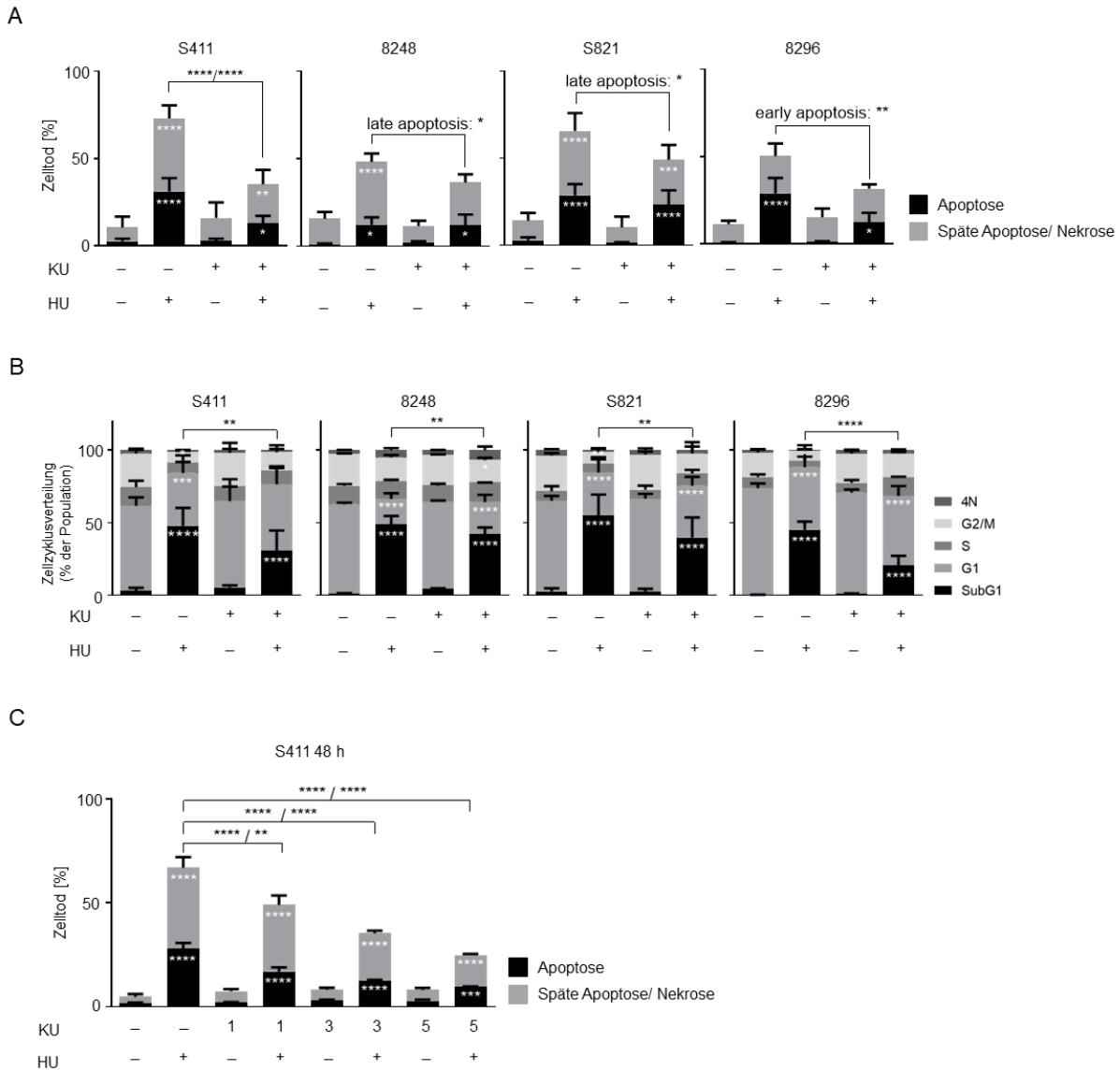


Abbildung 23: FACS-Analysen zeigen die Effekte von HU und KU-60019 auf die Zellzyklusverteilung und die Apoptose-assoziierte DNA-Fragmentierung [440]. (A) Die Zelllinien S411, 8248, S821 und 8296 wurden 48 h mit 5 μ M KU-60019 und 1 mM HU behandelt. Der Zelltod wurde mittels Durchflusszytometrie und Annexin-V/PI-Färbung analysiert; $n = 7$ (S821), $n = 6$ (S411), $n = 3$ (8248/8296). (B) Die Zellen wurden wie in (A) beschrieben für 48 h behandelt. Die Zellzyklusverteilung und die SubG1-Population wurden mittels Durchflusszytometrie an PI-gefärbten Zellen gemessen; $n = 3$. Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$, **** $0,0001$). (C) Die Zelllinie S411 wurde 48 h mit 1 mM HU in Kombination mit einer Dosisreihe von 1 – 5 μ M KU-60019 behandelt. Der Zelltod wurde mittels Durchflusszytometrie und Annexin-V/PI-Färbung analysiert; $n = 3$. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $0,0001$).**

Da S411 Zellen am sensitivsten auf HU reagierten (s. **Abb. 20**), wurde der Einfluss von KU-60019 in dieser Zelllinie genauer untersucht. Dafür wurden die Zellen mit 1 mM HU und 1 – 5 μ M KU-60019 für 48 h behandelt. Die Annexin-V Färbung bestätigte den Effekt von KU-60019 in mit HU behandelten Zellen. Umso höher die KU-60019-Konzentration, desto mehr konnten die zytotoxischen Effekte von HU abgeschwächt werden (**Abb. 23C**). Somit konnte bestätigt werden, dass eine pharmakologische Inhibierung der Funktionen von ATM eine anti-apoptotische Wirkung in HU-behandelte PDAC Zellen zur Folge hat.

Um die ATM abhängigen Effekte aus **Abb. 23** zu verifizieren, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Dafür wurden alle vier murine PDAC Zelllinien mit 1 mM HU und 5 μ M KU-60019 behandelt und für weitere 24 h kultiviert. Zelllysate wurden hergestellt, aufgetragen und analysiert.

A

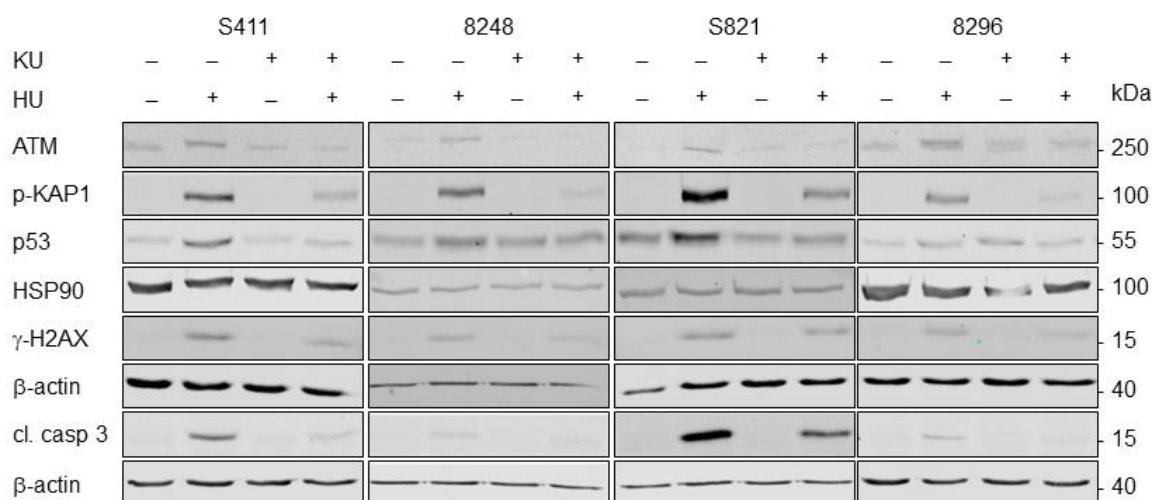


Abbildung 24: Immunoblots zeigen die Auswirkungen von HU und KU-60019 auf die DNA-Schadensantwort [440]. (A) Die Zelllinien S411, 8248, S821 und 8296 wurden 24 h mit 5 μ M KU-60019 und 1 mM HU behandelt. Immunoblots wurden durchgeführt, um die gezeigten Proteine zu detektieren; n = 3.

Die HU-abhängige Phosphorylierung von KAP1 und H2AX wurde in allen vier Zelllinien durch die Kombination mit KU-60019 reduziert. Die HU-Behandlung führte in allen Zellen zu einer Akkumulation von p53 und der Caspase-3 nach 24 h. Durch die Zugabe von KU-60019 zu den HU-behandelten Zellen konnte die Aktivierung von p53 und Caspase-3 in allen getesteten Zellen verringert werden. Dabei zeigten S411 und S821 Zellen eine stärkere Aktivierung von Caspase-3 als 8248 und 8296 Zellen. Nach 24 h zeigte KU-60019 in der Einzelbehandlung bei keiner Zelllinie nennenswerte Effekte in der Immunoblot Analyse (**Abb. 24**). Die Daten aus **Abb. 23** und **Abb. 24** zeigen, dass ATM die Induktion von Apoptose in HU-behandelten PDAC Zellen fördert.

5. Ergebnisse

5.2. Charakterisierung der Effekte eines Topoisomerase-1-Inhibitors in murinen PDAC Zelllinien

5.2.1. Zellzyklusanalyse von IT-behandelten murinen PDAC Zellen

Der Topoisomerase-1-Inhibitor IT wird häufig auch den PatientInnen mit einer PDAC Erkrankung verabreicht [443, 444]. Daher wurde untersucht, wie IT die murinen PDAC Zellen beeinflusst.

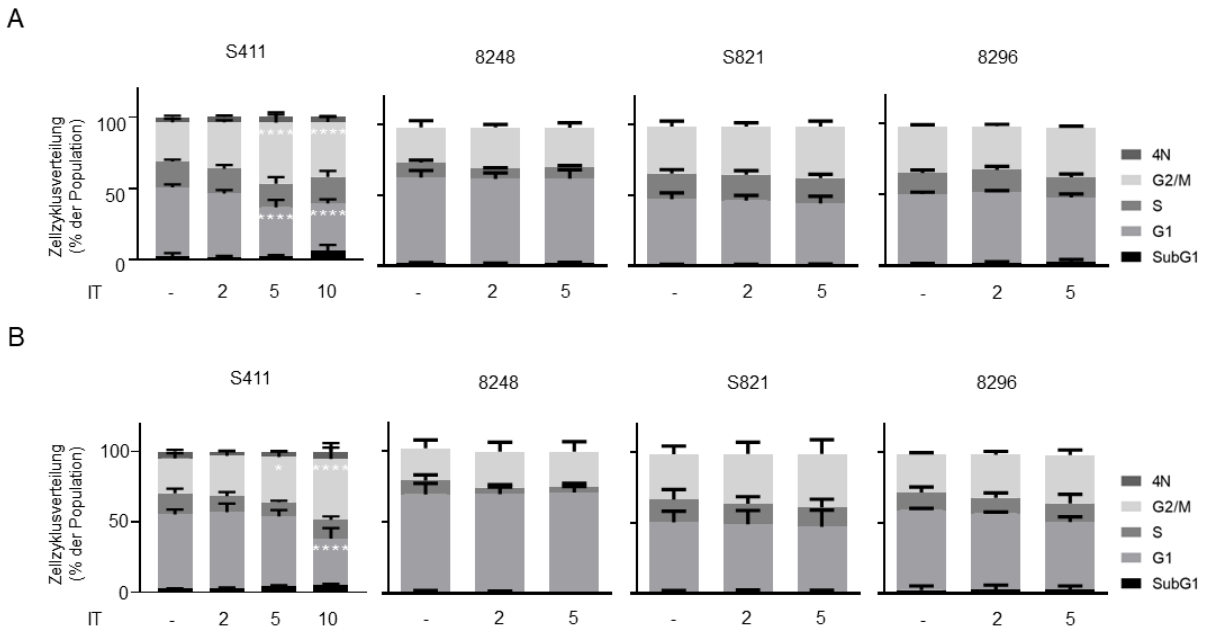


Abbildung 25: Irinotecan zeigt keine Wirkung in allen getesteten murinen PDAC Zelllinien [440]. (A) Die Zelllinien 8248, S821 und 8296 wurden mit 2 µM und 5 µM IT für 24 h behandelt. Die S411 Zellen wurden zusätzlich mit 10 µM IT für denselben Zeitraum behandelt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und fixiert. Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie von PI-gefärbten Zellen ermittelt und sind als Mittelwert \pm SD angegeben; $n = 3$. (B) Der Versuchsansatz wurde für 48 h wiederholt. Die Zellzyklusverteilung wurde durchflusszytometrisch erfasst; $n = 3$. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Alle vier Zelllinien wurden mit 2 – 5 µM IT für 24 h (**Abb. 25A**) und 48 h (**Abb. 25B**) behandelt. Da S411 Zellen aus vorherigen Untersuchungen eine erhöhte Sensitivität gegenüber HU zeigte (s. **Abb. 20**), wurde diese zusätzlich noch mit 10 µM IT behandelt, um mögliche Effekte zu steigern.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigten, dass mit steigender IT Dosis ein Arrest der Zellen in der G2/M-Phase erzielt wurde, welche mit einer Abnahme der G1-Phase verbunden war. Dieser Unterschied war in S411 Zellen nach 24 h mit 5 µM und 10 µM IT statistisch signifikant. Nach 48 h konnte der hochsignifikante Unterschied nur mit 10 µM IT gehalten werden.

Die Zunahme der G2/M-Phase war überraschenderweise bei keiner IT Dosis mit einer Zunahme der SubG1-Phase verbunden, da die SubG1-Fraktion weder nach 24 h noch nach 48 h signifikante Änderung zeigte. Zusätzlich zeigten S411 Zellen bei einer Konzentration von 10 μ M IT keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu 5 μ M IT, was auf das Erreichen eines Plateaus hindeutet. Im Gegensatz dazu, zeigten S821, 8296 und 8248 Zellen sowohl nach 24 h als auch nach 48 h keine nennenswerten Effekte mit dem TOP-1-Inhibitor IT (**Abb. 25A, B**).

5.2.2. Die Inhibitoren IT und HU im direkten Vergleich

Für zusätzliche Analysen wurden S411 Zellen mit 1 mM HU oder 5 μ M IT für 24 h (**Abb. 26A**) und 48 h (**Abb. 26B**) behandelt. Die Apoptoserate wurde anhand von Annexin-V und PI positiven Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. Die Ergebnisse zeigten, dass nach 24 h weder HU noch IT signifikant Apoptose induzieren konnte (**Abb. 26A**). Nach 48 h zeigten IT-behandelte Zellen weiterhin keine Unterschiede zur Kontrollprobe, während HU-behandelte Zellen eine Gesamtapoptose von 76,6 % erreichte (**Abb. 26B**). Die Resultate aus **Abb. 26A** und **Abb. 26B** wurden in einem Immunoblot verifiziert. Dafür wurden S411 Zellen mit 5 μ M IT und 1 mM HU behandelt und für weitere 24 h inkubiert. HU zeigte wie erwartet eine Induktion der DNA-Schadensantwort, sowie eine Aktivierung der Checkpoint-Kinasen und eine Induktion der Apoptose. Dies zeigte sich deutlich durch die starke Induktion von p-KAP1, p53, γ -H2AX (Ser15) und Caspase-3. Darüber hinaus konnte in HU-behandelten Zellen kein CHK1 mehr nachgewiesen werden. Es kam zusätzlich zu einer Abnahme des PR130 und des RAD51 Spiegels in HU-behandelten S411 Zellen.

IT zeigte im Gegensatz zu HU in S411 Zellen nur eine leichte Induktion von ATM, p-KAP1 und dem Tumorsuppressorgen p53. Die Induktion von p53 führte sowohl mit IT als auch mit HU zu einer Zunahme von p21. Dabei konnte festgestellt werden, dass der p21-Spiegel keine großen Unterschiede zeigten im Vergleich zum p53-Spiegel in den HU und IT behandelten Zellen (**Abb. 26C**).

5. Ergebnisse

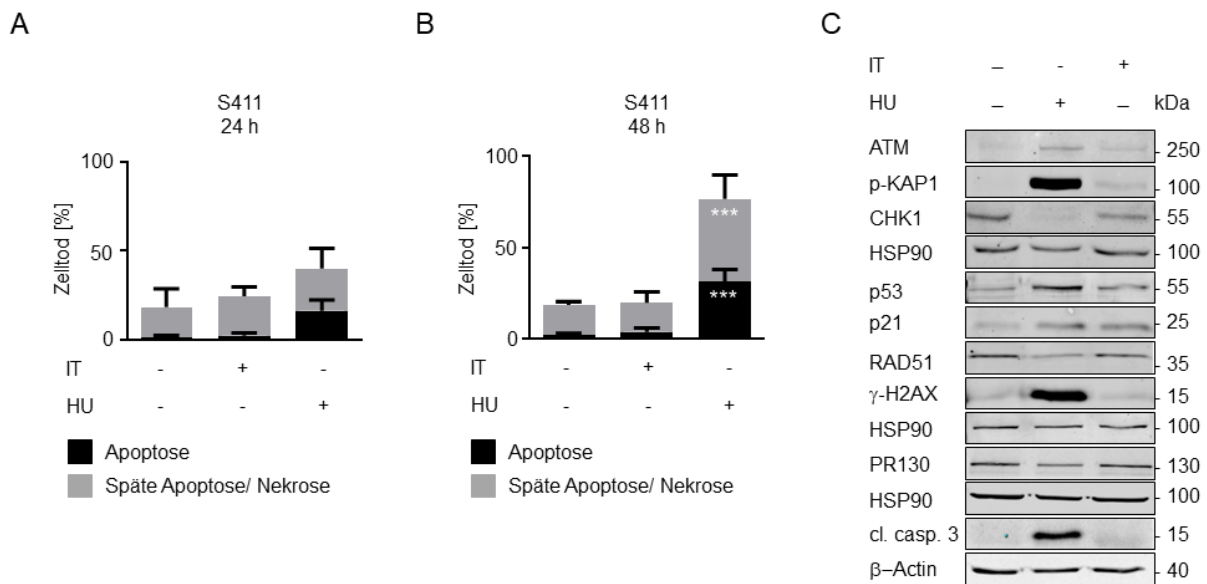


Abbildung 26: **HU induziert Apoptose effektiver als IT im PDAC Zellsystem [440].** (A) S411 Zellen wurden mit 5 µM IT und 1 mM HU behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und mit Annexin-V/PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert; $n = 3$. (B) Die murine PDAC Zelllinie wurden 48 h mit 5 µM IT und 1 mM HU inkubiert. Die Detektion von Annexin-V/PI positiven Zellen am Durchflusszytometer erfolgte unmittelbar nach der Ernte; $n = 3$. Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt ($*** p < 0,001$). (C) S411 Zellen wurden mit 5 µM IT und 1 mM HU behandelt und für weitere 24 h kultiviert. Nach der Ernte wurden Lysate hergestellt, die per Immunoblot analysiert wurden. Es wurden die gezeigten Proteine detektiert. HSP90 und β -Actin dienten als Ladekontrolle; $n = 3$.

5.3. Analyse der biochemischen und zellulären Wirkung eines weiteren RNRi in murinen PDAC Zellen

5.3.1. COH29 Behandlung führt zur DNA-Fragmentierung in murinen PDAC Zellen

Um weitere Inhibitoren und deren Effekte im PDAC Zellsystem zu untersuchen, wurden S411 Zellen mit einem weiteren RNRi behandelt und sowohl durchflusszytometrisch als auch mittels einer Western Blot Analyse analysiert (**Abb. 27**). Es wurde bereits gezeigt, dass COH29 die RNR stärker hemmt als HU [204].

Die Ergebnisse dieser Analyse zeigten, dass COH29 nach 24 h die SubG1-Fraktion mit allen verwendeten Dosen signifikant erhöhte (**Abb. 27A**). Nach 48 h war der Effekt ähnlich. Mit 40 µM COH29 verlor die SubG1-Fraktion zwar die Signifikanz, diese konnte jedoch mit 50 µM COH29 wieder nachgewiesen werden (**Abb. 27B**).

Auffällig war hier, dass weder eine höhere COH29 Dosis noch eine längere Expositionszeit die SubG1-Fraktion in S411 verstärkt haben.

Die G1-Phase wurde sowohl nach 24 h als auch nach 48 h reduziert, was mit einer Akkumulation der Zellen in der S-Phase einher ging. Die beschriebenen Effekte waren statistisch relevant.

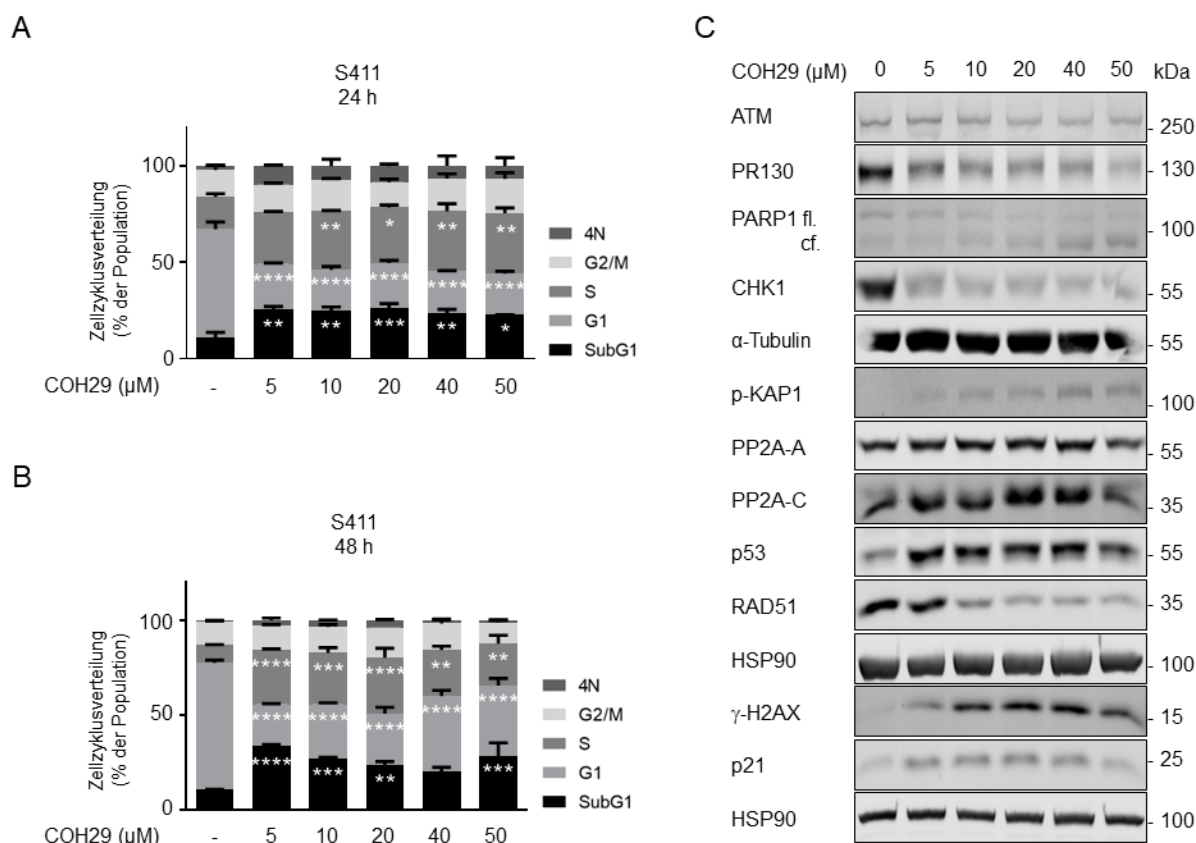


Abbildung 27: **COH29 Behandlung führt zur Zelltodinduktion im PDAC Zellsystem [440]. (A)** S411 Zellen wurden mit einer Dosisreihe von 5 – 50 μM COH29 behandelt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und fixiert. Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie von PI-gefärbten Zellen ermittelt und sind als Mittelwert \pm SD angegeben; $n = 3$. **(B)** Die murine PDAC Zelllinie wurde mit einer Dosisreihe von 5 – 50 μM COH29 inkubiert. Eine Detektion von PI positiven Zellen am Durchflusszytometer wurde durchgeführt; $n = 3$. Alle Daten aus (A) und (B) sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). **(C)** S411 Zellen wurden mit 5 – 50 μM COH29 behandelt und für weitere 24 h kultiviert. Nach der Ernte wurden Lysate hergestellt, welche im Immunoblot analysiert wurden. Es wurden die gezeigten Proteine detektiert. HSP90 und α -Tubulin dienten als Ladekontrolle; $n = 3$.

Die biochemischen Effekte von COH29 waren mit denen von HU vergleichbar. Eine Immunoblot Analyse zeigte ebenfalls die Reduktion von CHK1, RAD51 und PR130 durch COH29. Wie bereits in HU-behandelten Zellen analysiert, konnte auch hier eine Induktion von p-KAP1, p53, γ -H2AX und p21 gezeigt werden. Zusätzlich konnte eine dosisabhängige Spaltung von PARP1 durch COH29 nachgewiesen werden (**Abb. 27C**). Diese Ergebnisse zeigen, dass COH29 ebenfalls wie HU die Apoptose, Checkpoint-Kinasen und DNA-Schäden induziert, was ihre gemeinsame Zielhemmung bestätigt. Im direkten Vergleich der RNR-Inhibitoren zeigte COH29 deutlichere Effekte auf den Zellzyklus, während HU seine Effektivität in der SubG1-Induktion demonstrierte.

5. Ergebnisse

5.4. Charakterisierung der murinen PDAC Zelllinien hinsichtlich ihrer biologischen Effekte auf die Anwendung des PP2A-Inhibitors PD

5.4.1. Gliederung der murinen PDAC Zellen in verschiedene Subtypen

In den **Kapiteln 5.1 – 5.3** wurde bereits ausführlich über die Reaktionen von murinen PDAC Zellen auf epigenetische Substanzen und DNA-Replikationsstressinduktoren analysiert. Bei diesen Analysen wurde festgestellt, dass die die Proteinexpression von PR130 zwischen den verschiedenen PDAC Zelllinien erheblich variierte. Dieser Befund führte dazu, dass die unterschiedlichen B-Untereinheiten in PDAC genauer untersucht werden mussten. Dafür wurden 15 mesenchymale und 23 epitheliale Zelllinien verwendet, die aus genetisch definierten murinen PDACs isoliert waren [385, 398, 445]. Durch die genauere Betrachtung der mRNA-Expressionsniveaus dieser Zellen, wurde festgestellt, dass mesenchymale PDAC Zellen eine höhere Expression der Ppp2r3a-mRNA aufweisen. Die epithelialen Zelllinien zeigten diesen Effekt nicht. Darüber hinaus war dieser Effekt Ppp2r3a spezifisch und galt nicht für andere PP2A-B Untereinheiten oder der katalytische/regulatorischen PP2A Untereinheit Ppp2ca und Ppp2r1a (**Abb. 28A**). Durch eine Quantifizierung der Daten aus **Abb. 28A** konnte ein statistisch signifikanter Unterschied in der Ppp2r3a mRNA-Expression zwischen den epithelialen und den mesenchymalen Zelllinien nachgewiesen werden (**Abb. 28B**).

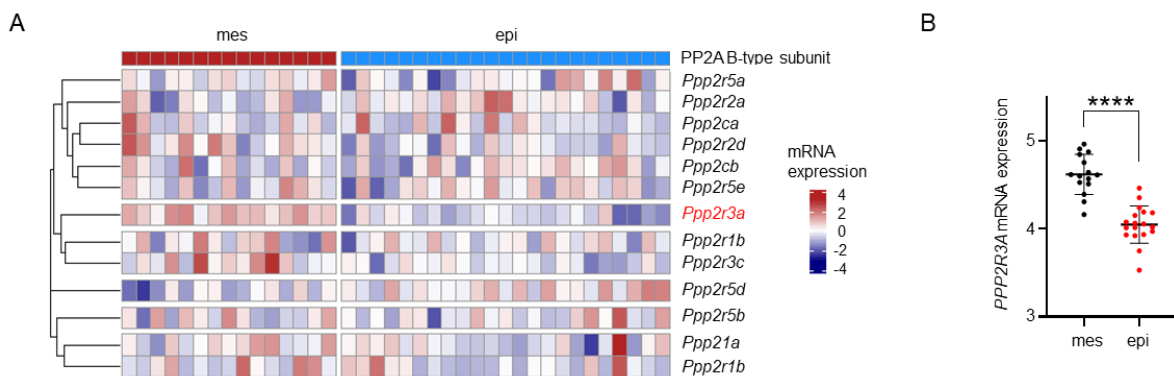


Abbildung 28: Ppp2r3a werden im mesenchymalen PDAC Subtyp stärker exprimiert. (A) Heatmap der farbkodierten mRNA-Expressionsdaten für die dargestellten PP2A-Untereinheiten in murinen mesenchymalen (rot, $n = 15$) und epithelialen (blau, $n = 23$) durch RNA-Sequenzierung. Das Clustering der Zeilen basiert auf der Pearson-Korrelation (Cutree = 6). **(B)** RNA-Sequenzanalysen zur Bestimmung der mRNA-Expressionsniveaus von Ppp2r3a in murinen PDAC Zelllinien; $n = 15$ (mesenchymal) und $n = 18$ (epithelial). Die Daten wurden mit einem ungepaarten t -Test statistisch ausgewertet (**** $p < 0,0001$). Die y-Achse wird als log2-transformierte Größe dargestellt und ist auf den totalen mRNA-Gehalt normalisiert. Die Experimente aus (A) und (B) entstammen aus dem Antrag, der für die Projektgründung verwendet wurde. Die Daten wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Schneider an der TUM generiert und zur Verfügung gestellt.

Im nächsten Schritt wurden verschiedene Proteine im unbehandelten Zustand der murinen PDAC Zelllinien näher untersucht. Eine Western Blot Analyse bestätigte die Ergebnisse aus **Abb. 28**, denn der PR130 Spiegel variierte auch auf Proteinebene in den unterschiedlichen Zellen. Die mesenchymalen Zelllinien zeigten dabei eine höhere PR130 Expression als die Zellen des epithelialen Subtyps (**Abb. 29A**). Eine Quantifizierung der Daten bestätigte den signifikanten Unterschied (**Abb. 29B**).

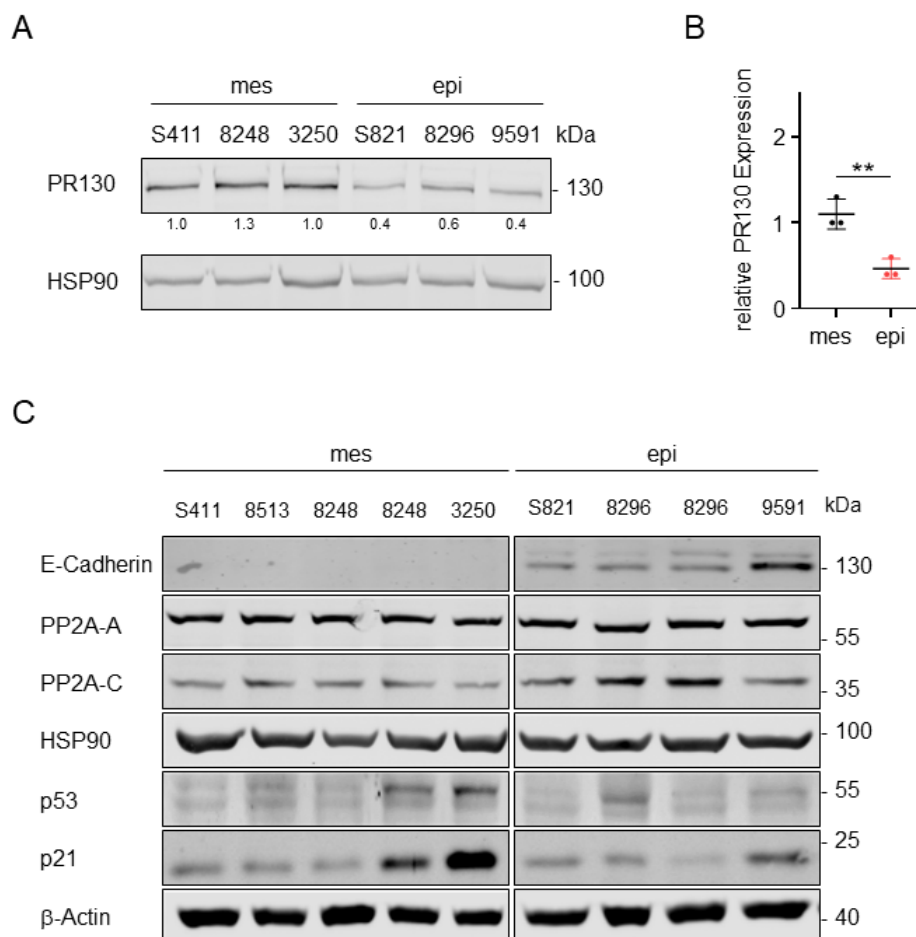


Abbildung 29: **PR130 ist auf Proteinebene im mesenchymalen PDAC Subtyp stark ausgeprägt.** (A) Immunoblots verdeutlichen den PR130-Spiegel in unbehandelten mesenchymalen und epithelialen murinen PDAC Zelllinien. HSP90 ist die Ladekontrolle; $n = 3$. (B) Quantifizierung der Expression von PR130 auf Proteinebene; ungepaarter t -Test, (** $p < 0,01$). (C) Western Blot Analysen zeigen den basalen Gehalt an PP2A-A, PP2A-C, p53 und p21. Der Nachweis von E-Cadherin bestätigt den epithelialen Ursprung des epithelialen Subtyps. HSP90 und β -Actin dienen als unabhängige Ladekontrollen; $n = 2$.

Durch die Detektion von E-Cadherin konnte der Ursprung der Zellen nachgewiesen werden. Nur in den epithelialen Zelllinien konnte das transmembrane Epithelzellidentitätsmarker E-Cadherin nachgewiesen werden. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Expression von PP2A-A (strukturelle Untereinheit) und PP2A-C (katalytische Untereinheit) zwischen den epithelialen und mesenchymalen Zelllinien vergleichbar war.

5. Ergebnisse

Das Tumorsuppressorgens p53 und sein direktes Zielprotein p21 waren ebenfalls nicht auffällig unterschiedlich im mesenchymalen und epithelialen Subtyp. Allerdings zeigten 3250 Zellen einen deutlich höheren p21-Spiegel im Vergleich zu allen Zelllinien.

5.4.2. Der mesenchymale Subtyp reagiert hoch sensitiv auf PD

Nun soll explizit auf die Bedeutung von PP2A in PDAC Zellen eingegangen werden. Dafür wurden die murinen PDAC Zelllinien S411, 8248, S821 und 8296 mit dem niedermolekularen (*small molecule*) PP2A-Inhibitor PD behandelt [216]. Mikroskopische Aufnahmen der Zellen nach 24 h zeigte den deutlichen Effekt von PD im mesenchymalen Subtyp. S411 und 8248 Zellen nahmen nach 24 h Behandlung eine rundliche Form an und lösten sich vom Flaschenboden (**Abb. 30A**). Im Gegensatz dazu veränderte PD die Morphologie der S821 und 8296 Zellen nicht (**Abb. 30B**).

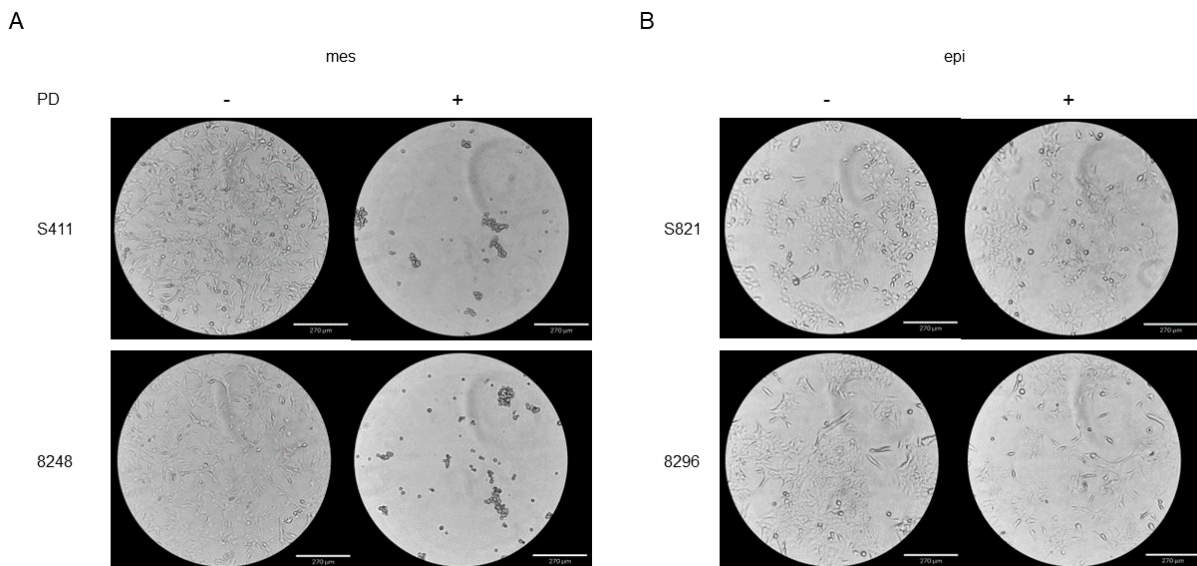
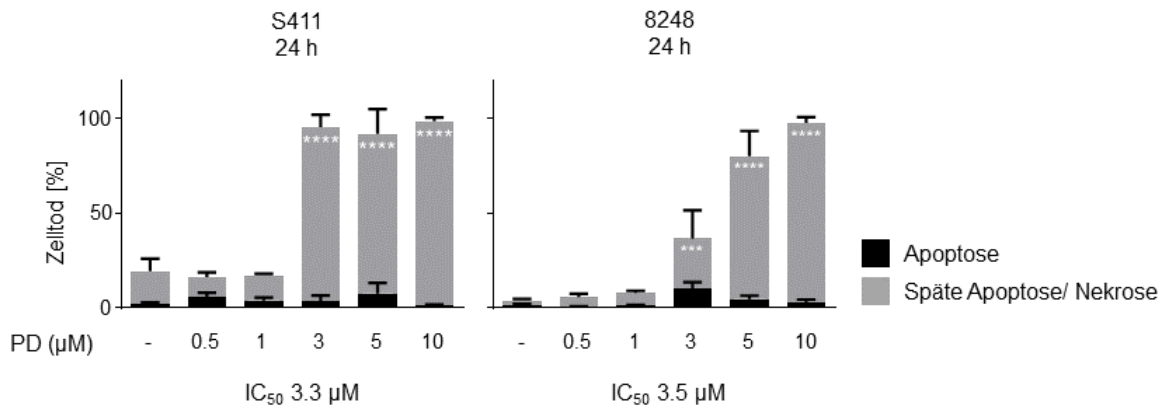


Abbildung 30: **Der mesenchymale Subtyp des PDAC ist empfindlich gegenüber dem PP2A-Inhibitor PD.** (A) Morphologie der mesenchymalen PDAC Zellen nach Behandlung mit 3 µM PD für 24 h; n = 3. (B) Der epitheliale Subtyp wurde ebenfalls für 24 h mit 3 µM PD inkubiert. Die mikroskopischen Bilder zeigen den Zustand der Zellen nach der Behandlung; n = 3.

Die Ergebnisse aus **Abb. 30A** lassen vermuten, dass in PD-behandelte S411 und 8248 Zellen Apoptose induziert wird. Durch eine Annexin/PI Färbung und einer durchflusszytometrischen Analyse konnte diese Vermutung bestätigt werden (**Abb. 31**). Nach 24 h waren bereits 3 µM PD ausreichend, um in S411 und 8248 Zellen Apoptose signifikant zu induzieren. Dabei war auffällig, dass die Zellen in der späten Apoptose/Nekrose akkumulierten.

Während die Gesamtapoptose bei 3 μM PD in S411 auf 95,7 % anstieg, stieg sie in 8248 Zellen nur auf 36,7 % an. Mit 5 μM PD wurde eine Gesamtapoptose von 80,4 % in 8248 Zellen erreicht, wohingegen die Behandlung mit 10 μM PD in diesen Zellen zu einer Gesamtapoptose von 97,8 % führte (**Abb. 31A**).

A



B

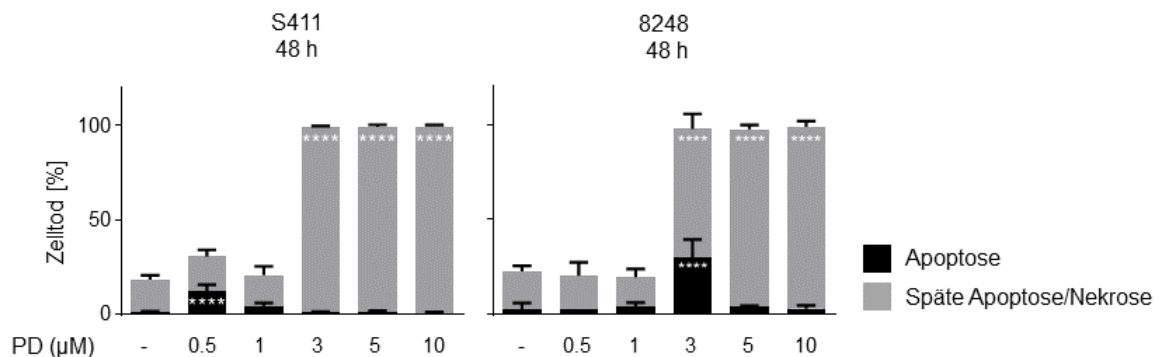


Abbildung 31: **Annexin-V Färbung und Zelltodbestimmung der murinen mesenchymalen PDAC Zelllinien.** (A) Die mesenchymalen Zelllinien S411 und 8248 wurden mit einer Dosisreihe von 0,5 μM - 10 μM PD behandelt. Zur Bestimmung der Zellvitalität und Apoptose wurden die Zellen nach 24 h geerntet und mit Annexin-V/PI angefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert; $n = 3$. (B) Die Zelllinien S411 und 8248 wurden mit denselben Konzentrationen wie in (A) behandelt und für 48 h inkubiert. Auch hier wurde die Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie ermittelt; $n = 3$. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben; Die Daten wurden statistisch mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) analysiert (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

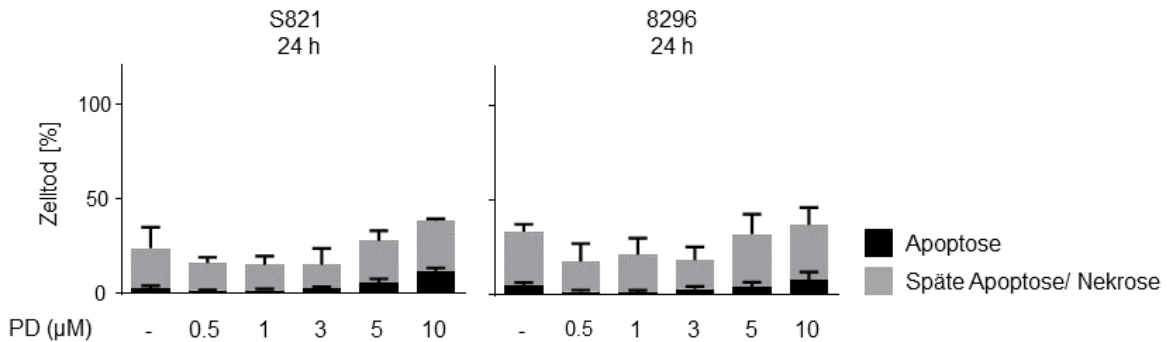
Nach 48 h zeigten S411 Zellen keine gravierenden Veränderungen im Vergleich zu den 24 h Werten. Die Dosen 3 μM , 5 μM und 10 μM PD führten bei diesen Zellen zu einer 100 %-tigen Apoptoserate. Mit 0,5 μM PD konnte eine signifikante Zunahme der frühen Apoptose in S411 verzeichnet werden. Die Signifikanz ging jedoch mit 1 μM PD wieder verloren. 8248 Zellen zeigten mit 3 μM PD ebenfalls eine sehr hohe Gesamtapoptose (97,7 %), wobei eine beachtliche Anzahl von Zellen in der frühen Apoptose akkumulierten. Mit 5 μM und 10 μM akkumulierten die Zellen ausschließlich in der späten Apoptose/Nekrose. Die niedrigeren Dosen von 0,5 μM und 1 μM PD konnte auch nach 48 h in 8248 Zellen keine Apoptose induzieren.

5. Ergebnisse

5.4.3. Der epitheliale Subtyp ist robust gegenüber einer PD Behandlung

Die Analysen aus **Abb. 31** wurden auch in den epithelialen Zelllinien S821 und 8296 durchgeführt. Die Zellen wurden mit 0.5 – 10 μM PD für 24 h und 48 h behandelt, mit Annexin-V/PI angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (**Abb. 32**).

A



B

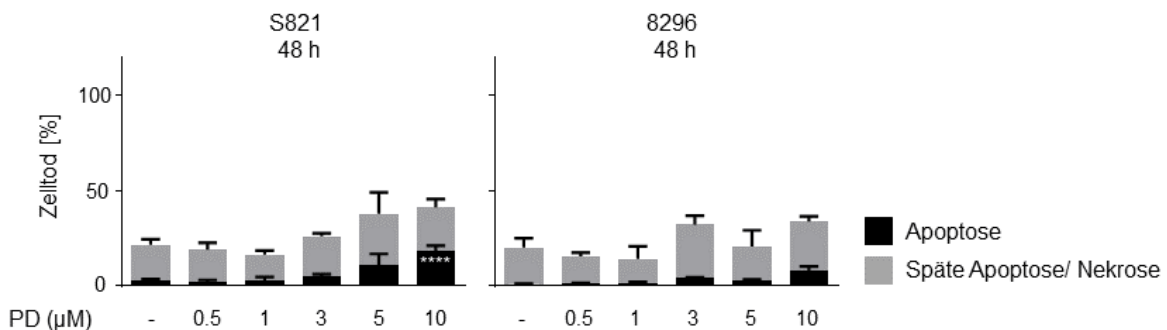


Abbildung 32: **Annexin-V/PI-Färbung und Zelltodbestimmung der murinen epithelialen PDAC Zelllinien nach PD-Behandlungen.** (A) Die epithelialen Zelllinien S821 und 8296 wurden mit einer Dosisreihe von 0.5 μM - 10 μM PD behandelt. Zur Bestimmung der Zellvitalität und Apoptose wurden die Zellen nach 24 h geerntet und mit Annexin-V/PI angefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert; $n = 3$. (B) Die Zelllinien S411 und 8248 wurden mit denselben Konzentrationen wie in (A) behandelt und für 48 h inkubiert. Auch hier wurde die Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie ermittelt; $n = 3$. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben; Die Daten wurden statistisch mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) analysiert (**** $p < 0,0001$).

Sowohl in S821 als auch in 8296 Zellen wurden keine signifikanten Unterschiede nach 24 h festgestellt (**Abb. 32A**). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da die Ergebnisse aus **Abb. 30** ebenfalls keine morphologischen Unterschiede im epithelialen Subtyp aufzeigten. Nach 48 h zeigten S821 Zellen mit 10 μM PD eine signifikante Akkumulation in der frühen Apoptose. Dies konnte mit keiner PD Konzentration in 8296 Zellen erreicht werden (**Abb. 32B**).

Da bereits eine dosisabhängige Reaktion mit PD in murinen PDAC Zelllinien gezeigt werden konnte, sollen die Effekte dieses PP2A-Inhibitors nun in einem Zeitverlauf untersucht werden. Dafür wurden die vier Zelllinien mit 10 μ M PD behandelt, nach 1 h, 3 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h und 24 h geerntet und der Zelltod durchflusszytometrisch bestimmt (**Abb. 33**). Die Dosis von 10 μ M wurde ausgewählt, damit das Eintreten von möglichen Effekten auch im epithelialen Subtyp nach kurzen Zeitwerten gewährleistet werden kann.

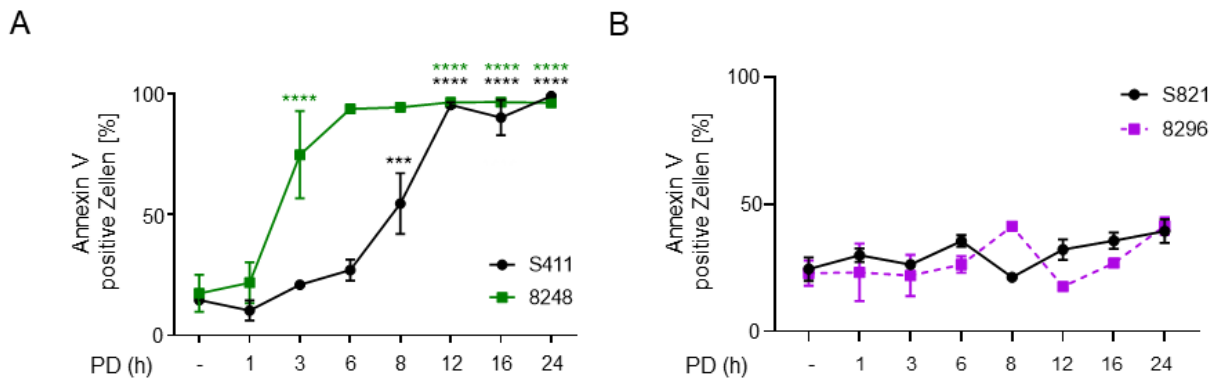


Abbildung 33: Ein Zeitverlauf der PD-Behandlung zeigt nach kurzen Zeitwerten die zunehmende Apoptoserate des mesenchymalen Subtyps. (A) S411 und 8248 Zellen wurden mit 10 μ M PD behandelt und nach den angegebenen Zeitwerten geerntet. Annexin-positive Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen; $n = 2$. (B) S821 und 8296 Zellen wurden ebenfalls mit 10 μ M PD behandelt. Nach Ablauf der angegebenen Zeitwerte wurden Annexin-V Messungen durchgeführt; $n=2$. Alle Daten wurden mit einem ungepaarten t-Test statistisch ausgewertet (***) $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

8248 Zellen erreichten schon nach 3 h eine statistisch relevante Zunahme der Apoptose, während dieser Vorgang erst nach 8 h bei den S411 Zellen eintrat. Nach 12 h waren sowohl die Zellen der Zelllinien S411 und 8248 so gut wie 100 % Annexin/PI – positiv (**Abb. 33A**). Die epithelialen S821 und 8296 Zellen zeigten auch mit 10 μ M PD zu keinem Zeitpunkt signifikante Änderungen bezüglich der Induktion einer Apoptose (**Abb. 33B**).

Die zeitabhängige Analyse von PD-behandelten PDAC Zelllinien bestätigte erneut die vorherigen Ergebnisse aus den **Kapiteln 5.4.1 – 5.4.2**. An dieser Stelle konnte eine klare Aussage getroffen werden, hinsichtlich der Expression von PR130 und der Herkunft dieser Zellen. Mesenchymale Zelllinien, die eine höhere Expression von PR130 aufweisen, reagieren sensitiv auf den PP2A-Inhibitor PD. Die epithelialen Zelllinien, die weniger Ppp2r3a mRNA und PR130 aufweisen, zeigen eine gewisse Resistenz gegenüber PD. Auf dieser Basis soll im Verlauf dieser Dissertation aufgebaut werden.

5. Ergebnisse

5.4.4. Zellzyklusanalyse der mit PD behandelten Zelllinien nach 24 h und 48 h

Im nächsten Schritt wurde eine Zellzyklusanalyse in den murinen PDAC Zelllinien durchgeführt. Dafür wurden alle vier Zelllinien mit 1 μM und 3 μM PD behandelt. S411, 8248 und S821 Zellen wurden zusätzlich mit 0.5 μM PD behandelt. Die Proben wurden nach 24 h geerntet und für eine FACS Analyse vorbereitet.

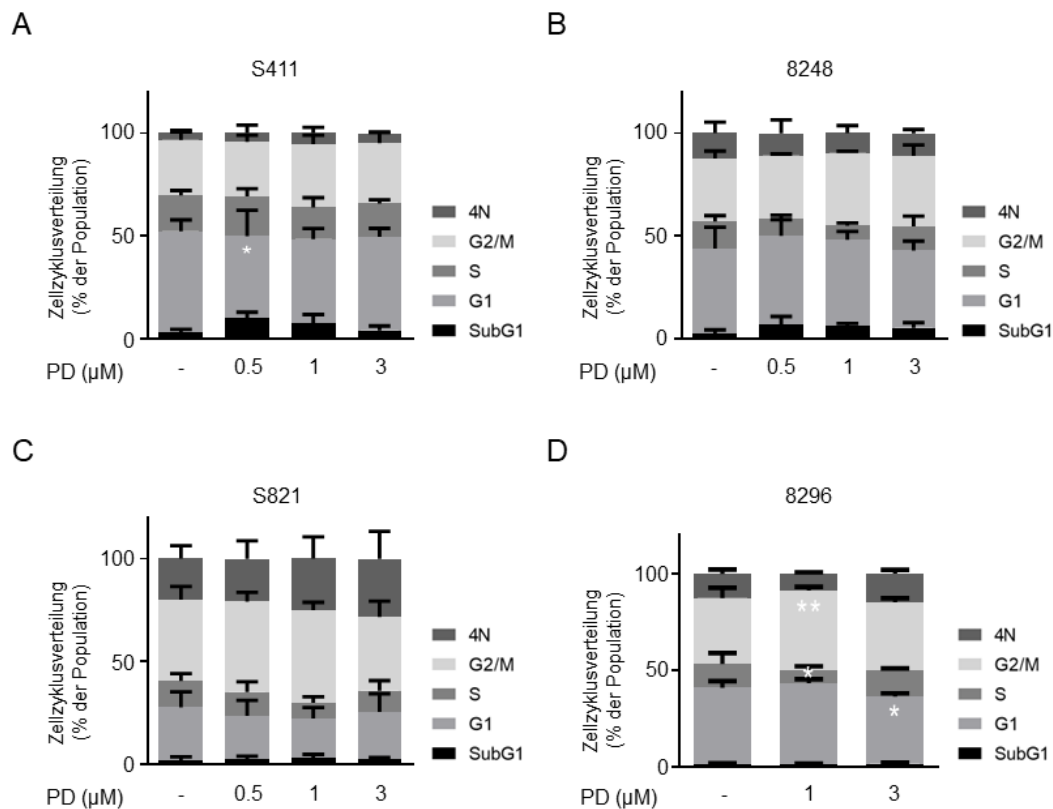


Abbildung 34: **FACS Analysen zeigen die Auswirkungen auf den Zellzyklus von PD in murinen PDAC Zelllinien.** Die Zelllinien (A) S411, (B) 8248, (C) S821 und (D) 8296 wurden 24 h mit bis zu 3 μM PD behandelt. Die Zellzyklusverteilung und die SubG1-Population wurden mittels Durchflusszytometrie an PI-gefärbten Zellen gemessen; $n = 3$. Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Nach 24 h zeigten S411 Zellen eine signifikante Abnahme der G1-Phase. Bei allen anderen Dosen wurden keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt (**Abb. 34A**). 8248 und S821 Zellen zeigten ebenfalls keine signifikanten Änderungen der Zellzyklusphasen mit PD nach 24 h. In S821 Zellen konnte jedoch eine tendenzielle Zunahme der G2/M mit 0.5 μM und 1 μM PD wahrgenommen werden. Außerdem zeigte auch die polyploide Fraktion dieser Zellen einen zunehmenden Trend mit steigender PD Dosis. Diese Befunde waren jedoch nicht statistisch relevant (**Abb. 34B, C**).

8296 Zellen zeigten im Gegensatz zu allen anderen Zelllinien eine signifikante Abnahme der S-Phase, welche mit einer Zunahme der G2/M-Phase einherging. Mit 3 μM PD konnten diese Signifikanzen jedoch nicht mehr nachgewiesen werden. Dafür konnte eine statistisch relevante Abnahme der G1-Phase verzeichnet werden (**Abb. 34D**).

Die SubG1-Fraktion nahm überraschenderweise weder im mesenchymalen noch im epithelialen Subtyp mit PD zu. Dieses Ergebnis stand im Widerspruch zu den Beobachtungen aus der Zelltodanalyse mittels Annexin-V/PI Färbung im mesenchymalen Subtyp (s. **Abb. 31**).

Eine Analyse der Zellzyklusphasen wurde ebenfalls nach 48 h durchgeführt. Hier erreichte die SubG1-Phase der S411 Zellen bei 3 μM PD zwar eine hohe statistische Signifikanz, spiegelte mit 23 % der Zellen in SubG1 jedoch immer noch nicht die Ergebnisse aus den Annexin Messungen wider. Mit 10 μM PD konnte in diesen Zellen zusätzlich eine signifikante Abnahme der G1-Phase verzeichnet werden (**Abb. 35A**).

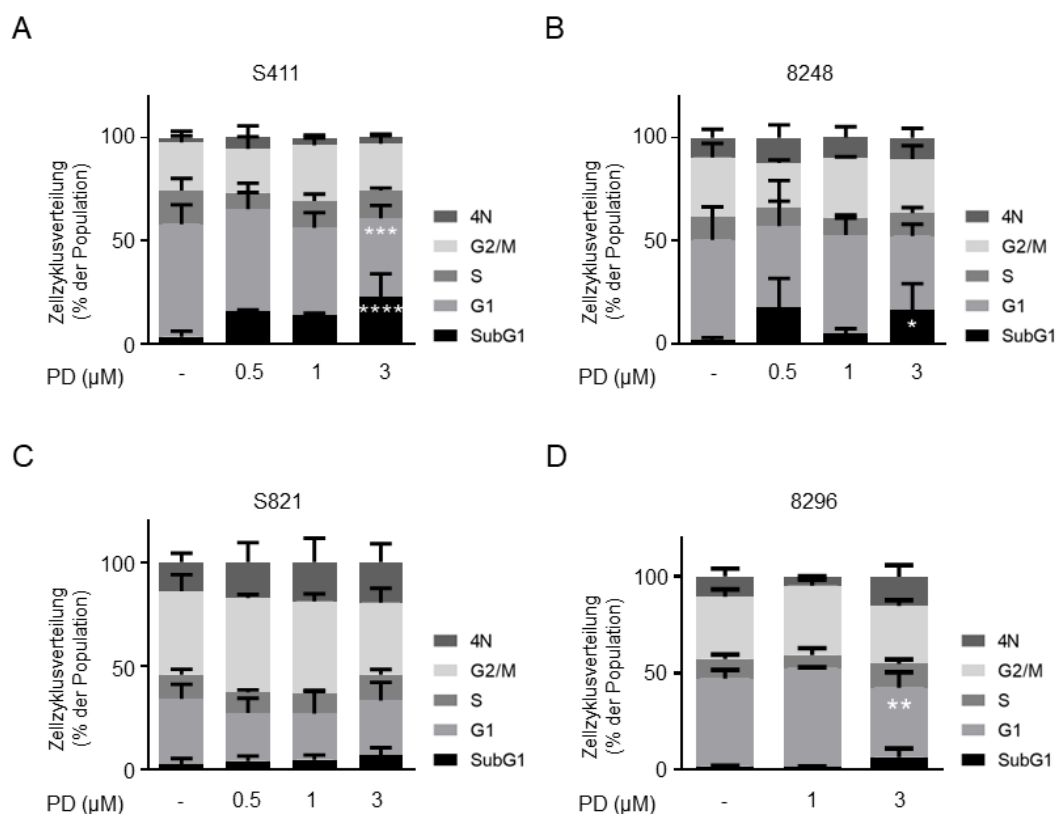


Abbildung 35: Zellzyklusanalyse der murinen PDAC Zelllinien bei einer PD-Behandlung nach 48 h. Die Zelllinien (A) S411, (B) 8248, (C) S821 und (D) 8296 wurden 48 h mit bis zu 3 μM PD behandelt. Die Zellzyklusverteilung und die SubG1-Population wurden mittels Durchflusszytometrie an PI-gefärbten Zellen gemessen; $n = 3$. Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

5. Ergebnisse

8248 Zellen zeigten mit 3 μM PD eine statistisch relevante Zunahme der SubG1-Fraktion nach 48h, jedoch ist der Wert von nur 19,2 % ebenfalls gering (**Abb. 35B**). Die beschriebenen Beobachtungen für S821 Zellen nach 24 h trafen ebenfalls für den Zeitwert 48 h zu. Auch nach 48 h konnte in S821 Zellen keine relevanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle beschrieben werden (**Abb. 35C**). 8296 Zellen zeigten, wie bereits für den 24 h Wert beschrieben, auch nach 48 h eine signifikante Abnahme der G1-Phase mit 3 μM PD. Für den gleichen Zeitwert konnte in diesen Zellen auch eine tendenzielle Zunahme der polyploiden Fraktion mit 3 μM PD wahrgenommen werden.

5.4.5. Kurzzeiteffekte von PD im mesenchymalen und epithelialen Subtyp

Um die unterschiedlichen Effekte von PD in den mesenchymalen und epithelialen Subtypen besser verstehen zu können, wurde das Zellsystem auf eine Hyperphosphorylierung von PP2A Zielproteinen überprüft. Dafür wurde eine mesenchymale und eine epitheliale Zelllinie mit 3 μM PD behandelt und nach 1 h, 3 h und 6 h geerntet, da der Zeitverlauf bereits nach diesem Zeitwert eine Reaktion mit PD in den mesenchymalen Zelllinien zeigte (s. **Abb. 33A**). Die Dosis von 3 μM wurde ausgewählt, da hier die Apoptoserate noch nicht all zu hoch war, sodass auch aus der mesenchymalen Zelllinie Lysate hergestellt werden konnten.

A

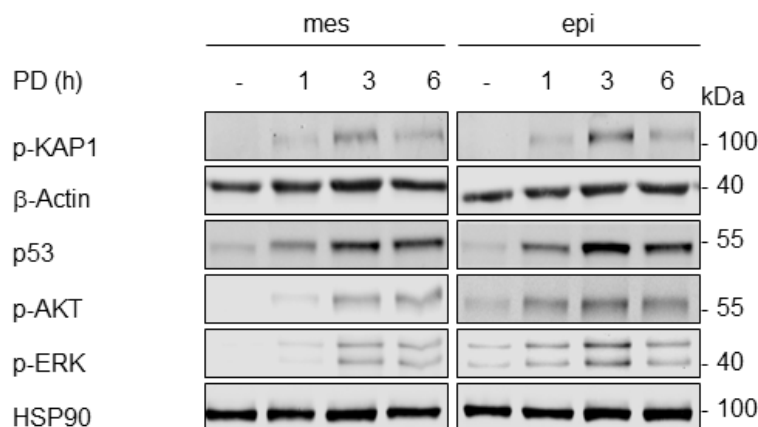


Abbildung 36: Die PD-Behandlung führt nach kurzen Zeitwerten zu einer Aktivierung der DNA-Schadensantwort, sowie der PI3K/AKT und MAPK/ERK Signalwege im epithelialen und mesenchymalen Subtyp. (A) Mesenchymale und epitheliale murine PDAC Zelllinien wurden mit 3 μM PD behandelt und für 1 h, 3 h und 6 h kultiviert. Das Tumorsuppressorgen p53, sowie die phosphorylierten Formen von KAP1, AKT und ERK wurden mittels Immunoblot nachgewiesen. HSP90 und β -Actin dienen als unabhängige Ladekontrollen; n = 3.

Eine anschließende Western Blot Analyse zeigte, sowohl im mesenchymalen als auch im epithelialen Subtyp, eine erhöhte Phosphorylierung des ATM Zielproteins KAP1 nach einer 3-stündigen Behandlung mit PD. Außerdem führte die Behandlung mit PD in beiden Zelllinien zu einer Akkumulation von p53, p-AKT (Ser473) und p-ERK (Tyr202/Tyr204) (**Abb. 36A**). Somit konnte an dieser Stelle ausgeschlossen werden, dass die fehlende zytotoxische Wirkung von PD im epithelialen Subtyp auf eine mangelnde Aufnahme oder eine geringere biochemische Aktivität dieses Wirkstoffes in diesen Zellen zurückzuführen ist.

5.4.6. Die PD-bedingte Induktion der Apoptose in PDAC ist p53 unabhängig

In einer Studie von 2019 wurde eine Korrelation der regulatorischen Untereinheit PR130 mit dem Tumorsuppressorgen p53 in Leberkrebszellen festgestellt [100]. Dieses Erkenntnis legte die Vermutung nahe, dass die unterschiedlichen Reaktionen der PDAC Subtypen auf eine mögliche Variation der p53 Konzentration, zurückzuführen sind.

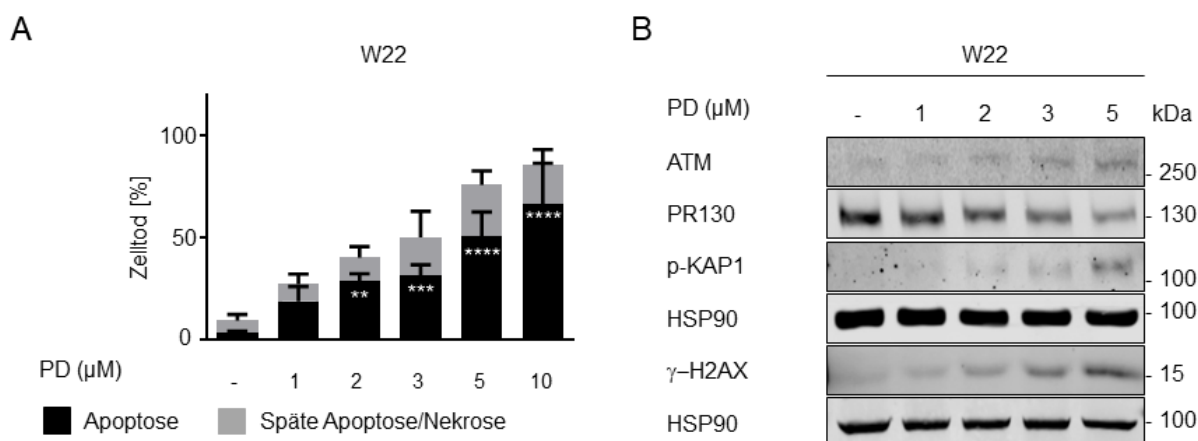


Abbildung 37: Die Induktion von Apoptose in PD-behandelten Zellen ist p53-unabhängig. (A) Die p53-Null-PDAC Zelllinie W22 wurde 24 h lang mit 1-10 µM PD behandelt. Der Zelltod wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt; $n = 3$. Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). (B) Die Immunoblot-Analyse wurde mit Lysaten von W22-Zellen durchgeführt, die 24 h mit 1-5 µM PD inkubiert wurden. Der Immunoblot wurde für die Detektion der angegebenen Proteine durchgeführt. HSP90 diente als Ladekontrolle; $n = 2$. Die Daten wurden ausschließlich von Frau Leydecker im Rahmen ihrer Dissertation generiert. Zur Erhöhung der Aussagekraft dieses Projektes wurden diese Daten in die Dissertation eingebaut.

Wie jedoch die **Abb. 36A** zeigte, wurde p53 sowohl in den PD-empfindlichen (mes) als auch in den PD-resistenten (epi) Subtyp durch PD induziert. Aufgrund dessen wurde zusätzlich überprüft, ob p53 für die Induktion der Apoptose und der DNA-Schadensantwort in diesen Zellen erforderlich ist.

Dazu wurde die murine mesenchymale p53-negative PDAC Zelllinie W22 mit 1-10 μM PD behandelt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass PD auch in p53-negativen Zellen dosisabhängig die Apoptose auslöste. Nach 24 h erreichte bereits 2 μM PD eine statistische Signifikanz und mit 10 μM PD stieg die Gesamtapoptose der W22 Zellen auf 85.6 % (**Abb. 37A**). In einer Western Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass in PD-behandelten W22 Zellen ATM induziert und seine direkten Zielproteine KAP1 und H2AX ebenfalls phosphoryliert wurden. Hierbei war auffällig, dass PR130 durch die PD-Behandlung reduziert wird (**Abb. 37B**).

5.5. Charakterisierung der biochemischen Effekte von PD in humanen PDAC Zelllinien

5.5.1. Zelltodbestimmung der PD-behandelten PDAC Zelllinien nach 24 h und 48 h

Nachdem die Effekte von PD in den murinen PDAC Zelllinien bereits charakterisiert wurden, soll nun die Rolle von PP2A/PR130 in humanen PDAC Zellen untersucht werden. Für die weiteren Analysen wurden die Zelllinien MIA PaCA-2, PANC-1, PSN-1, BxPC-3 und DAN-G verwendet. Alle Zelllinien wurden mit 0.5-10 μM PD für 24 h behandelt. Anschließend wurde der Zelltod anhand von Annexin/PI positiven Zellen durchflusszytometrisch ermittelt.

Die **Abb. 38A** zeigt beispielhaft die unterschiedlichen Populationen, die in einer FACS Analyse von PD-behandelten MIA PaCA-2 Zellen gemessen und analysiert wurden. Durch die Behandlung mit PD kann eine dosisabhängige Zunahme der Population in der Apoptose und Spätapoptose/Nekrose in diesen Zellen wahrgenommen werden. Die Zelltodanalyse zeigte mit 3 μM PD in allen getesteten Zelllinien eine signifikante Induktion der Apoptose nach 24 h. Dabei akkumulierten MIA PaCA-2, PSN-1 und BxPC-3 Zellen vorwiegend in der frühen Apoptose, während PANC-1 Zellen bei dieser Konzentration in der späten Apoptose/Nekrose zu finden waren. In PANC-1 Zellen waren die Unterschiede zwischen den Dosen 3 μM , 5 μM und 10 μM gering. Im Gegensatz dazu zeigten, alle anderen Zelllinien bei der Behandlung mit 5 μM oder 10 μM PD eine Zunahme der Apoptose (im Vergleich zu 3 μM PD).

In MIA PaCA-2 Zellen wurde mit 10 μM PD eine Gesamtapoptose von 67.0 % erreicht, in PANC-1 Zellen erreichte die Gesamtapoptose einen Wert von 68.3 %, in PSN-1 Zellen betrug die Gesamtapoptose 67.8 %, in BxPC-3 wurde 70.6 % und in DAN-G wurde 54.1 % Gesamtapoptose durch PD ausgelöst. Die Ergebnisse nach 24 h deuteten darauf hin, dass die DAN-G Zelllinie die geringste Empfindlichkeit gegenüber PD aufweist. Im Vergleich zu den murinen PDAC Zelllinien (s. **Abb. 31**) konnte hier auch mit der höchsten Dosis keine Apoptoserate von 100 % erreicht werden (**Abb. 38B – F**).

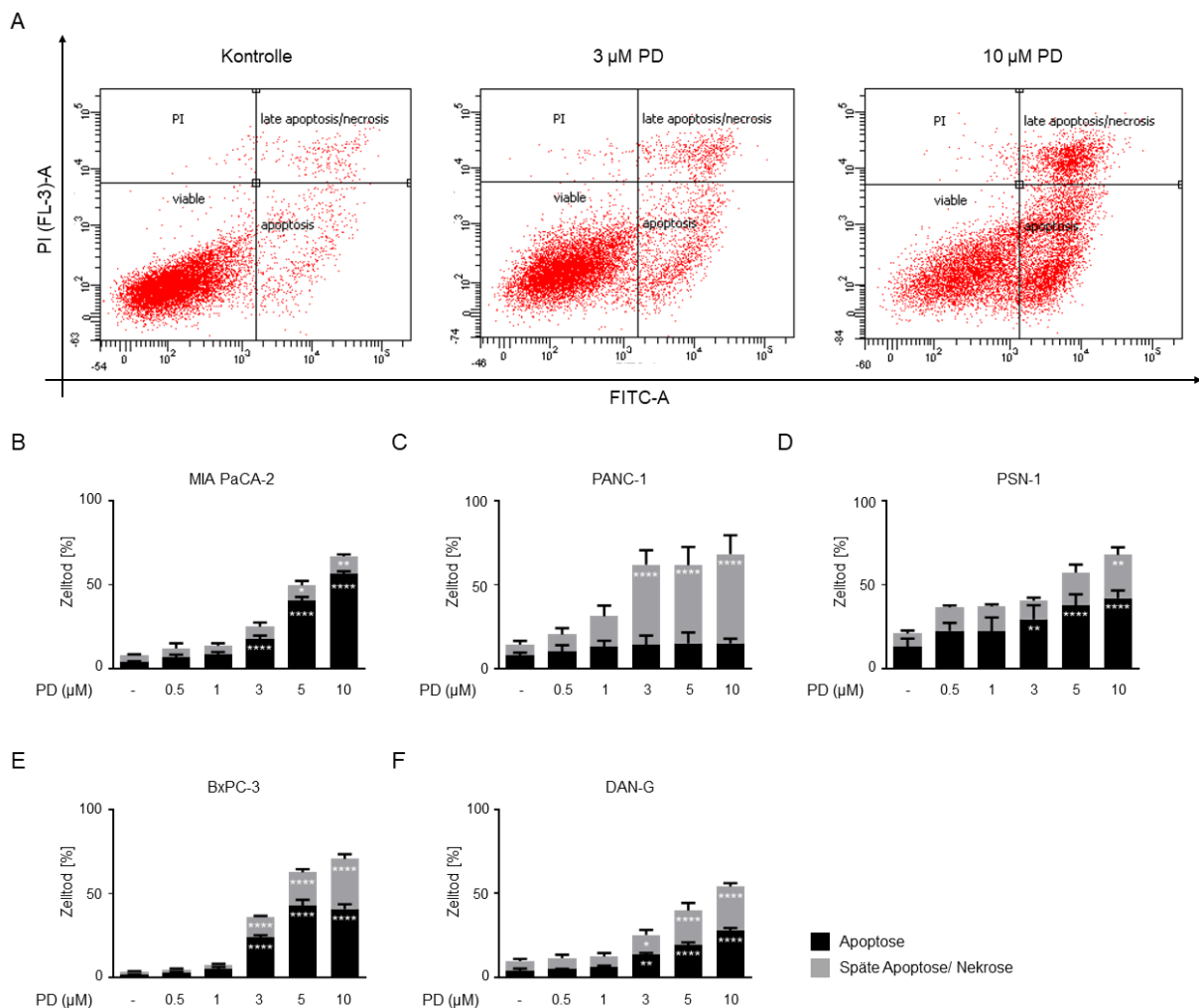


Abbildung 38: Der PP2A-Inhibitor PD induziert in humanen PDAC Zelllinien Apoptose. (A) Beispielhafte FACS Messung für eine Annexin/PI Färbung. Die verschiedenen Populationen werden in unterschiedlichen Quadranten aufgeteilt. Eine PD-Behandlung mit steigender Dosis zeigt eine Zunahme der rechten Quadranten, welches die Zellen in der Apoptose und in der Spätapoptose/Nekrose einschließt. Die Messung wurde mit MIA PaCA-2 Zellen durchgeführt und zeigen die Reaktion auf PD nach 24 h. Die humanen PDAC Zelllinien **(B)** MIA PaCA-2, **(C)** PANC-1, **(D)** PSN-1, **(E)** BxPC-3 und **(F)** DAN-G wurden mit einer Dosisreihe von 0.5 – 10 μM PD behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, mit Annexin-V/PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert; $n = 3$. Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; Statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

5. Ergebnisse

Die FACS Messungen aus **Abb. 38** wurden für den 48 h Wert wiederholt. Die bereits beschriebenen Effekte von PD nach 24 h konnten nach 48 h maximiert werden. Mit der höchsten Dosis von 10 μM PD stieg die Gesamtapoptose der MIA PaCA-2 Zellen auf 87.6 %, die der PANC-1 Zellen auf 95.3 %, die der PSN-1 Zellen auf 92.6 %, die der BxPC-3 Zellen auf 96.3 % und die der DAN-G Zellen auf 87.7 % (**Abb. 39A-E**). Zusätzlich wurden die IC_{50} Werte für die einzelnen Zelllinien bestimmt, wobei dieser für die PANC-1 und die PSN-1 Zellen im Vergleich zu den anderen Zelllinien niedriger ausfiel. Dennoch blieben die IC_{50} aus allen humanen Zelllinien vergleichbar.

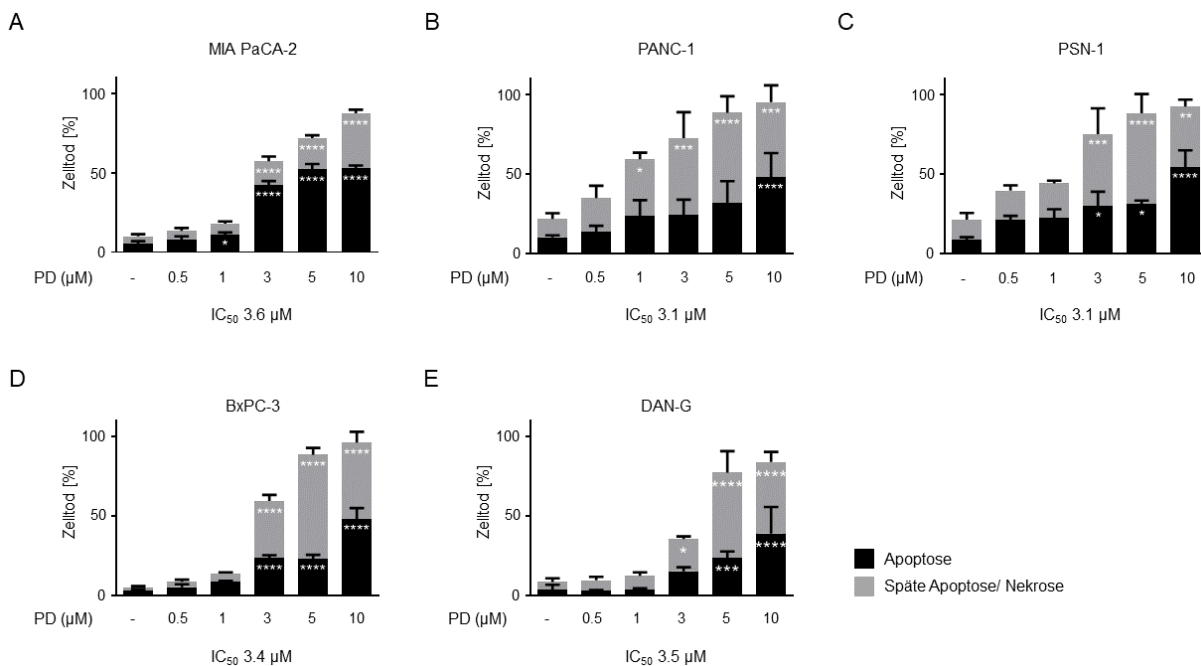


Abbildung 39: PD zeigt auch bei humanen PDAC Zelllinien zytotoxische Effekte. Die humanen PDAC Zelllinien (A) MIA PaCA-2, (B) PANC-1, (C) PSN-1, (D) BxPC-3 und (E) DAN-G wurden mit einer Dosisreihe von 0.5 – 10 μM PD behandelt. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, mit Annexin-V/PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert; $n = 3$. Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; Statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Die Ergebnisse aus **Abb. 39** waren vergleichbar mit den Ergebnissen aus den mesenchymalen murinen PDAC Zelllinien (s. **Abb. 32**). Somit konnte eine dosis- und zeitabhängige Wirkung von PD in den getesteten humanen PDAC Zelllinien festgestellt werden.

5.5.2. Apoptose als zentraler Zelltodmechanismus in humanen PDAC Zellen

Für eine weitere Bestätigung des Zelltodmechanismus, wurden MIA PaCA-2 Zellen mit 1 μM , 5 μM und 10 μM PD behandelt und auf den Apoptosemarker Caspase-3 untersucht. Bei 10 μM PD konnten die Isoformen der Caspase-3 nach 24 h detektiert werden (**Abb. 40A**). Darüber hinaus wurden MIA PaCA-2 Zellen mit PD und dem anti-apoptotischen Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen. Die Detektion der Annexin/PI positiven Zellen zeigte, dass Z-VAD-FMK die signifikanten apoptotischen Effekte von PD abschwächen, jedoch nicht vollständig unterdrücken konnten (**Abb. 40B**). Durch die Kombination von PD mit dem BCL-2-Inhibitor Navitoclax, welches die anti-apoptotischen Proteine hemmt, konnten die apoptotischen Effekte von PD zusätzlich statistisch signifikant verstärkt werden (**Abb. 40C**). Die epithelialen murinen PDAC Zelllinien zeigten nach 24 h und auch nach 48 h ein resistentes Verhalten gegenüber PD (s. **Abb. 32**). Durch die Kombination PD + Navitoclax konnte in S821 und 8296 Zellen die Apoptose signifikant induziert werden (**Anhang 2A – B**).

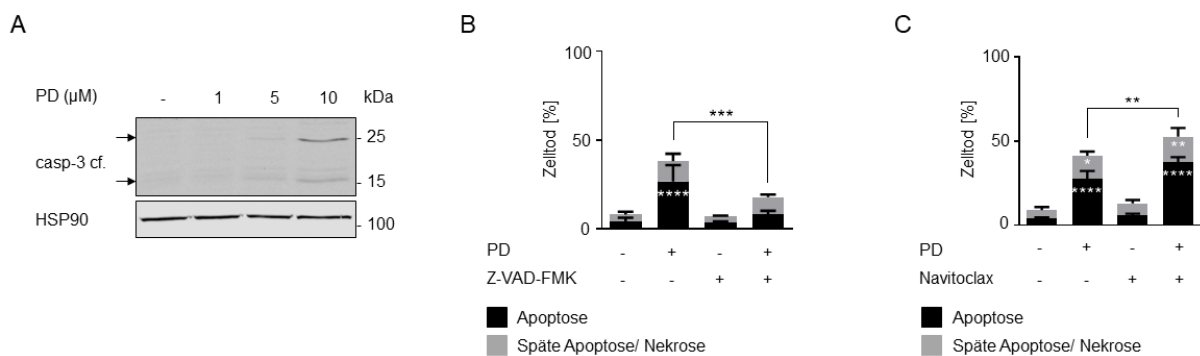


Abbildung 40: Apoptose ist der hauptsächliche Zelltodmechanismus, der bei einer PD-Behandlung in MIA PaCA-2 Zellen induziert wird. (A) MIA PaCA-2 Zellen wurden mit steigender Dosis von 1 – 10 μM PD behandelt, geerntet und lysiert. Ein Immunoblot wurde durchgeführt, um die gespaltenen Formen des Apoptosemarkers caspase-3 zu detektieren; $n = 3$. **(B)** MIA PaCA-2 Zellen wurden mit jeweils einzeln 3 μM PD und 50 μM des Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK und in Kombination behandelt. Die Ernte erfolgte nach 24 h. Die Annexin-V/PI gefärbten Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Der signifikante Unterschied zwischen der PD Einzelbehandlung und der Kombinationstherapie mit Navitoclax bezieht sich auf die Population in der Frühapoptose; $n = 3$. **(C)** MIA PaCA-2 Zellen wurden einzeln mit 3 μM PD und 5 μM des BCL-2 Inhibitor Navitoclax und in Kombination behandelt. Die Ernte erfolgte nach 24 h. Eine durchflusszytometrische Analyse der Annexin-V/PI gefärbten Zellen wurde durchgeführt. Die signifikante Zunahme zwischen der PD Einzelbehandlung und der Kombinationstherapie mit Navitoclax bezieht sich auf die Population in der Frühapoptose; $n = 3$. Die Daten aus (B) und (C) werden als Mittelwerte \pm SD dargestellt; Statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

5.5.3. Zellzyklusanalyse und Induktion von γ -H2AX in PD-behandelten MIA PaCA-2 Zellen

Nach der Zelltodbestimmung wurde eine Zellzyklusanalyse in MIA PaCA-2 Zellen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen mit 0.5 – 10 μ M PD für 24 h und 48 h behandelt. Nach 24 h konnte mit 1 μ M PD eine Abnahme der G1-Phase, einhergehend mit einer Zunahme der G2/M-Phase, festgestellt werden. Diese Effekte waren statistisch signifikant. Mit 3 μ M und 5 μ M PD blieben die G1-Phasen signifikant reduziert, die G2/M-Phase zeigte jedoch keine statistisch relevanten Änderungen im Vergleich zur Kontrolle auf. Mit 10 μ M PD waren die Zellzyklusphasen nicht mehr signifikant verschieden zur Kontrolle. Die SubG1-Fraktion der MIA PaCA-2 Zellen erreichte nach 24 h eine signifikante Zunahme mit 5 μ M PD, welche mit 10 μ M verstärkt werden konnten (**Abb. 41A**). Auch hier war auffällig, dass die SubG1-Fraktion gering ausfiel im Vergleich zu der Zelltodbestimmung (s. **Abb. 38**).

Nach 48 h konnte eine signifikante Abnahme der G1-Phase mit 1 μ M, 3 μ M, 5 μ M und 10 μ M PD nachgewiesen werden. Mit 1 μ M PD zeigte die G2/M eine tendenzielle Zunahme, welche jedoch keine statistische Relevanz erreichte. Bei 3 μ M, 5 μ M und 10 μ M PD akkumulierten signifikant mehr Zellen in der SubG1-Fraktion als in der Kontrollprobe (**Abb. 41B**).

Da in der SubG1-Fraktion die Zellen mit fragmentierter DNA vorliegen, wurde das Protein γ -H2AX im Immunoblot detektiert. Das Ergebnis korrelierte mit den Resultaten aus der FACS Analyse, da mit 5 μ M und 10 μ M PD eine klare Induktion von γ -H2AX festgestellt werden konnte (**Abb. 41C**). Zusätzlich wurde zum Nachweis der γ -H2AX Induktion eine IF in MIA PaCA-2 Zellen durchgeführt. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten eine Zunahme der γ -H2AX Foci nach 24 h bei Behandlung mit PD, welche nach einer quantitativen Analyse sich als statistisch signifikant erwies (**Abb. 41D, E**).

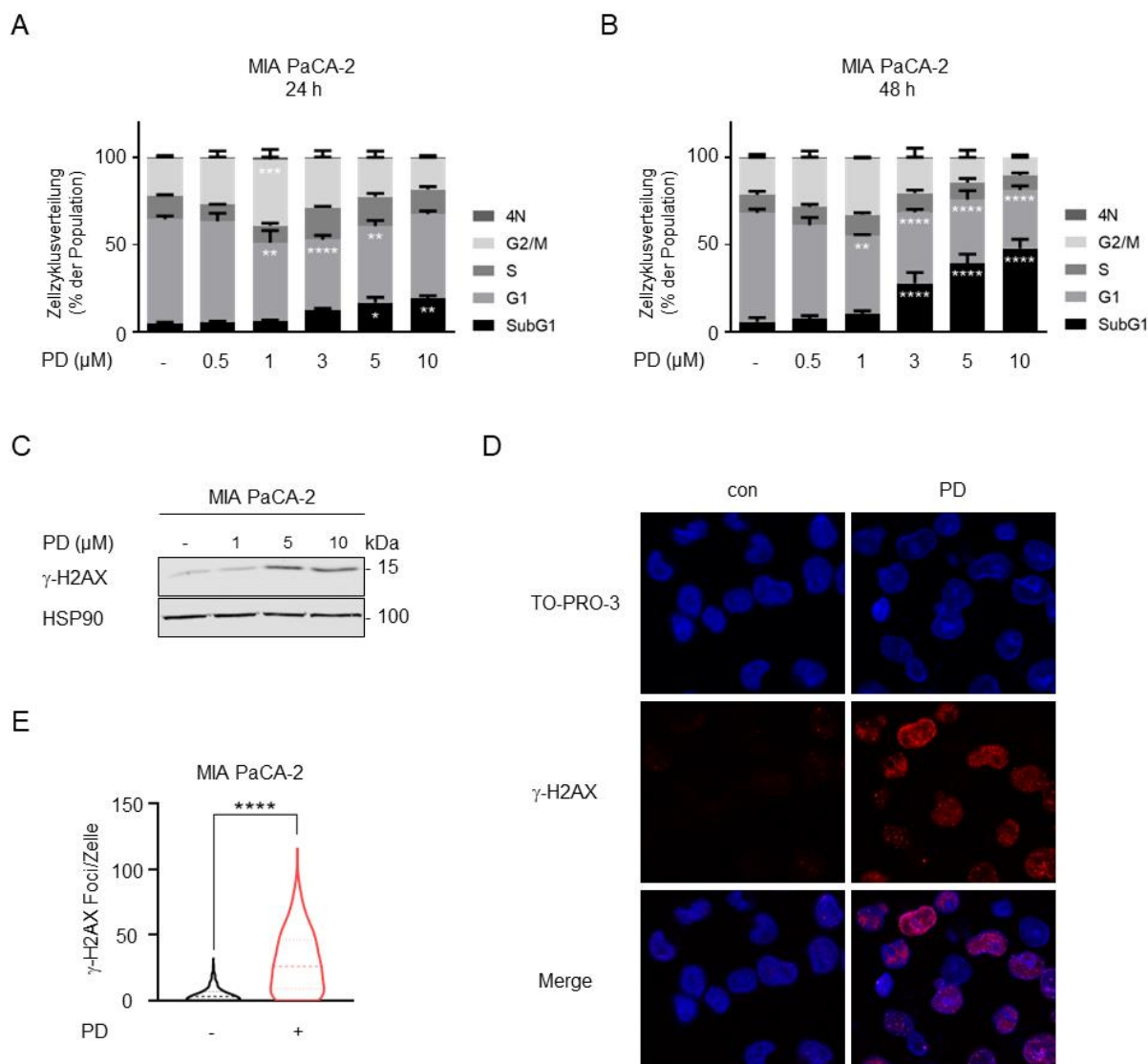


Abbildung 41: PD-Behandlung führt zu einer DNA-Fragmentierung in MIA PaCA-2 Zellen. (A) MIA PaCA-2 Zellen wurden mit einer Dosisreihe von 0.5 – 10 µM PD behandelt. Eine Detektion von PI positiven Zellen am Durchflusszytometer wurde durchgeführt; $n = 3$. (B) Der Versuchsansatz von (A) wurde für 48 h wiederholt. PI positive Zellen wurden durchflusszytometrisch detektiert; $n = 3$. Alle Daten aus (A) und (B) sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). (C) MIA PaCA-2 Zellen wurden 24 h mit 1 µM, 5 µM und 10 µM PD behandelt. Eine Western Blot Analyse wurde durchgeführt, um γ -H2AX zu detektieren. HSP90 diente als Ladekontrolle; $n = 3$. (D) MIA-PACA-2-Zellen waren entweder unbehandelt (con) oder wurden 24 h mit 3 µM PD behandelt, fixiert und mit anti- γ -H2AX Antikörper inkubiert. Zur Detektion wurde an Cy3 (rot) gekoppelte Antikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit TO-PRO3 angefärbt. Gezeigt werden repräsentative Bilder; $n = 2$. Die Analyse der γ -H2AX Foci pro Zelle wurde mit der Software ImageJ durchgeführt. Die Maßstabsleiste beträgt 10 µm. (E) Quantifizierung von γ -H2AX Foci in PD-behandelten MIA-PACA-2-Zellen. Die Daten wurden durch Zählen von je 100 Zellen in jedem von den 2 unabhängigen Durchläufen erhoben. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD angegeben, statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (one-way ANOVA) wurden durchgeführt (**** $p < 0,0001$).

5.5.4. Zellzyklusanalyse der mit PD behandelten PDAC Zelllinien

Eine Zellzyklusanalyse wurde ebenfalls in humane PDAC Zelllinien PANC-1, PSN-1, BxPC-3 und DAN-G für die Dosen von 0.5 – 10 μM PD durchgeführt. Nach 24 h wurde in PANC-1, PSN-1 und DAN-G die G1-Phase mit 0.5 μM PD signifikant reduziert, wobei die Reduktion in DAN-G Zellen hoch signifikant war. Nur in DAN-G Zellen konnte dieser Effekt mit 1 μM PD verstärkt werden. In PANC-1 und PSN-1 Zellen konnte mit 1 μM PD keine Reduktion der G1-Phase mehr beobachtet werden. Eine signifikante Reduktion der G1-Phase konnte in BxPC-3 Zellen mit den Konzentrationen 1 – 10 μM PD beobachtet werden (**Abb. 42A-D**).

Die G2/M-Phase zeigte eine signifikante Zunahme in BxPC-3 und DAN-G Zellen, wohingegen diese Beobachtungen nicht für PANC-1 und PSN-1 Zellen zutrafen. Darüber hinaus wurde noch eine signifikante Zunahme der S-Phase in DAN-G Zellen mit 1 μM PD wahrgenommen. Dieser Effekt konnte mit keiner anderen Dosis und bei keiner anderen Zelllinie beobachtet werden (**Abb. 42A-D**).

Nach 24 h Behandlung konnten auch nur DAN-G Zellen eine signifikante Zunahme der SubG1-Fraktion mit 3 μM , 5 μM und 10 μM PD vorweisen. Dieses Ergebnis war verwunderlich, da diese Zelllinie mit demselben Zeitwert in der Zelltodbestimmung die niedrigste Gesamtapoptose aufwies (s. **Abb. 38F**).

Nach 48 h zeigten PSN-1 das sensitivste Verhalten gegenüber PD, da mit 0.5 μM PD bereits eine hoch signifikante Apoptoserate induziert werden konnte. Dieser Effekt konnte mit höheren Dosen an PD zusätzlich verstärkt werden (**Abb. 42F**). Die beobachtete Reduktion der G1-Phase durch 0.5 μM PD nach 24 h, erreichte in PANC-1 nach 48 h eine höhere Signifikanz. Die Induktion der SubG1-Phase war mit 10 μM PD hoch signifikant in diesen Zellen (**Abb. 42E**).

Während in BxPC-3 Zellen nach 24 h noch eine signifikante Anzahl an Zellen in der G2/M arretierten, konnte dieser Effekt nach 48 h nur noch bei 1 μM PD beobachtet werden. Die SubG1-Fraktion konnte nur mit der höchsten Dosis von 10 μM PD eine statistische Relevanz erlangen (**Abb. 42G**).

In DAN-G Zellen wurde ab 3 μM PD die SubG1-Fraktion nach 48 h signifikant induziert. Eine Zunahme der G2/M-Phase konnte mit 0.5 μM und 1 μM PD beobachtet werden. Dieser signifikante Unterschied in der G2/M-Phase ging jedoch mit höheren Dosen an PD verloren (**Abb. 42H**).

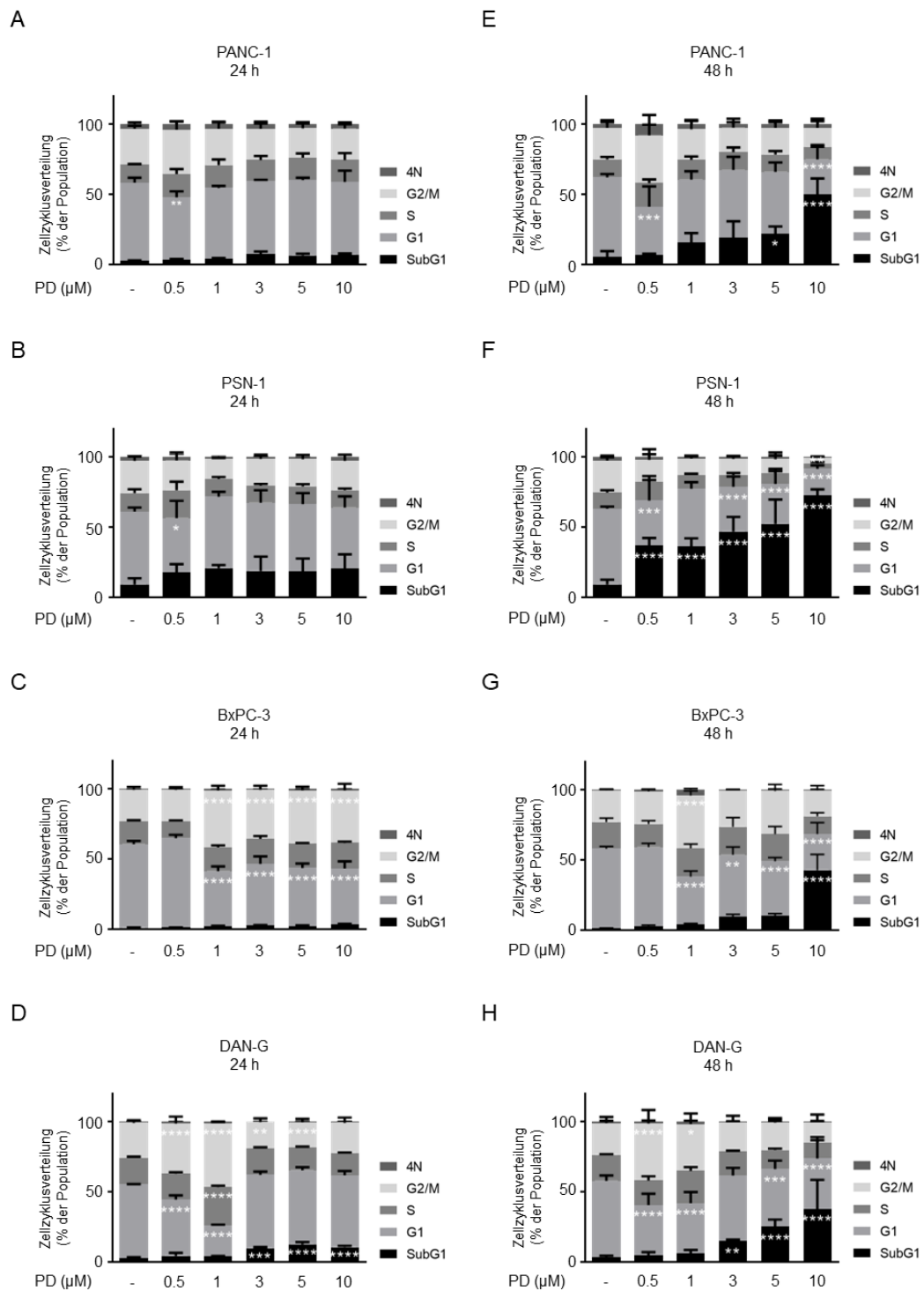


Abbildung 42: PD-Behandlung führt nach 48 h zu einer DNA-Fragmentierung in allen getesteten humanen PDAC Zelllinien. Eine Zellzyklusanalyse wurde in PANC-1 Zellen nach (A) 24 h und (E) 48 h durchgeführt. Dafür wurden die Zellen mit einer Dosisreihe von 0.5 – 10 µM PD behandelt und für die angegebene Zeit kultiviert. Die Daten entstammen aus durchflusszytometrischen Analysen der PI-positiven Zellen; jeweils $n = 3$. Die PSN-1 Zellen wurden mit 0.5 – 10 µM PD behandelt und für (B) 24 h und (F) 48 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend geerntet, fixiert, permeabilisiert und mit PI gefärbt. Es erfolgte eine FACS Analyse der PI-positiven Zellen; $n = 4$ (24 h), $n = 3$ (48 h). Die Zellzyklusanalyse wurde in BxPC-3 Zellen nach (C) 24 h und (G) 48 h ebenfalls durchgeführt. Dafür wurden die Zellen mit einer Dosisreihe von 0.5 – 10 µM PD behandelt und für die angegebene Zeit kultiviert. Die Daten entstammen aus durchflusszytometrischen Analysen der PI-positiven Zellen; jeweils $n = 3$. DAN-G wurden mit 0.5 – 10 µM PD behandelt und für (D) 24 h und (H) 48 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend geerntet, fixiert, permeabilisiert und mit PI gefärbt. Es erfolgte eine FACS Analyse der PI-positiven Zellen; $n = 3$ (E) – (G), $n = 7$ (H). Alle Daten (A) - (H) sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

5.5.5. PD Behandlung führt in allen getesteten humanen PDAC Zelllinien zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort

Analog zu den murinen PDAC Zelllinien wurden auch die biochemischen Effekte von PD in humanen PDAC Zelllinien auf Proteinebene analysiert. Dazu wurden alle fünf Zelllinien mit 0.5 – 10 μ M PD behandelt. Für DAN-G reichten die Lysate mit 10 μ M PD nicht aus, weshalb auf diese Dosis bei der Western Blot Analyse verzichtet werden musste.

Eine Behandlung mit PD löste bei allen Zelllinien eine Aktivierung von ATM aus, welches seine direkten Zielproteine p-ATM, p-KAP1 und γ -H2AX phosphorylierte. MIA PaCA-2 Zellen zeigten eine kontinuierliche Induktion von p-KAP1, welches bei 10 μ M seinen Hochpunkt erreichte. Bei den anderen Zelllinien erreichte p-KAP1 seine höchste Induktion bei einer bestimmten Konzentration und nahm bei höherer Konzentration wieder ab. Das Verhalten von p-KAP1 spiegelte sich nicht in der Expression von p-ATM in den betroffenen Zelllinien wider (**Abb. 43A-B**). Es kam bei allen Zelllinien zu einer Zunahme von p-AKT, welches mit der Abnahme von AKT1/2/3 einherging. Das Protein p-ERK zeigte nur eine klare Induktion in MIA PaCA-2, PSN-1 und BxPC-3, während eine Abnahme von ERK1/2 in PANC-1, BxPC-3 und DAN-G Zellen zu beobachten war (**Abb. 43A**).

Die Behandlung mit PD führte auch bei jeder Zelllinie zu einer Induktion von p-CHK1 (S345), welches in allen Fällen zu einer Abnahme von CHK1 passte. Der Tumorsuppressor p53 zeigte mit Ausnahme der MIA PaCA-2 Zellen eine Abnahme mit PD nach 24 h. Als weiteren Indikator für den Nachweis der Apoptose wurde Caspase-3 und seine pro-apoptotischen Isoformen detektiert. Die Spaltung von Caspase-3 konnte in MIA PaCA-2, BxPC-3 und DAN-G am deutlichsten nachgewiesen werden (**Abb. 43B**).

Durch die Detektion von E-Cadherin und Vimentin konnte der epitheliale bzw. der mesenchymale Ursprung der Zelllinien bestimmt werden. Bei MIA PaCA-2, PANC-1 und PSN-1 Zellen konnte Vimentin, als Marker für den mesenchymalen Subtyp, detektiert werden. Durch eine Behandlung mit PD wurden Spaltformen von Vimentin beobachtet. Diese waren in MIA PaCA-2 am deutlichsten zu erkennen. Für BxPC-3 und DAN-G Zellen konnte E-Cadherin detektiert werden. Es konnte eine dosisabhängige Induktion von E-Cadherin in diesen Zellen beobachtet werden (**Abb. 43B**).

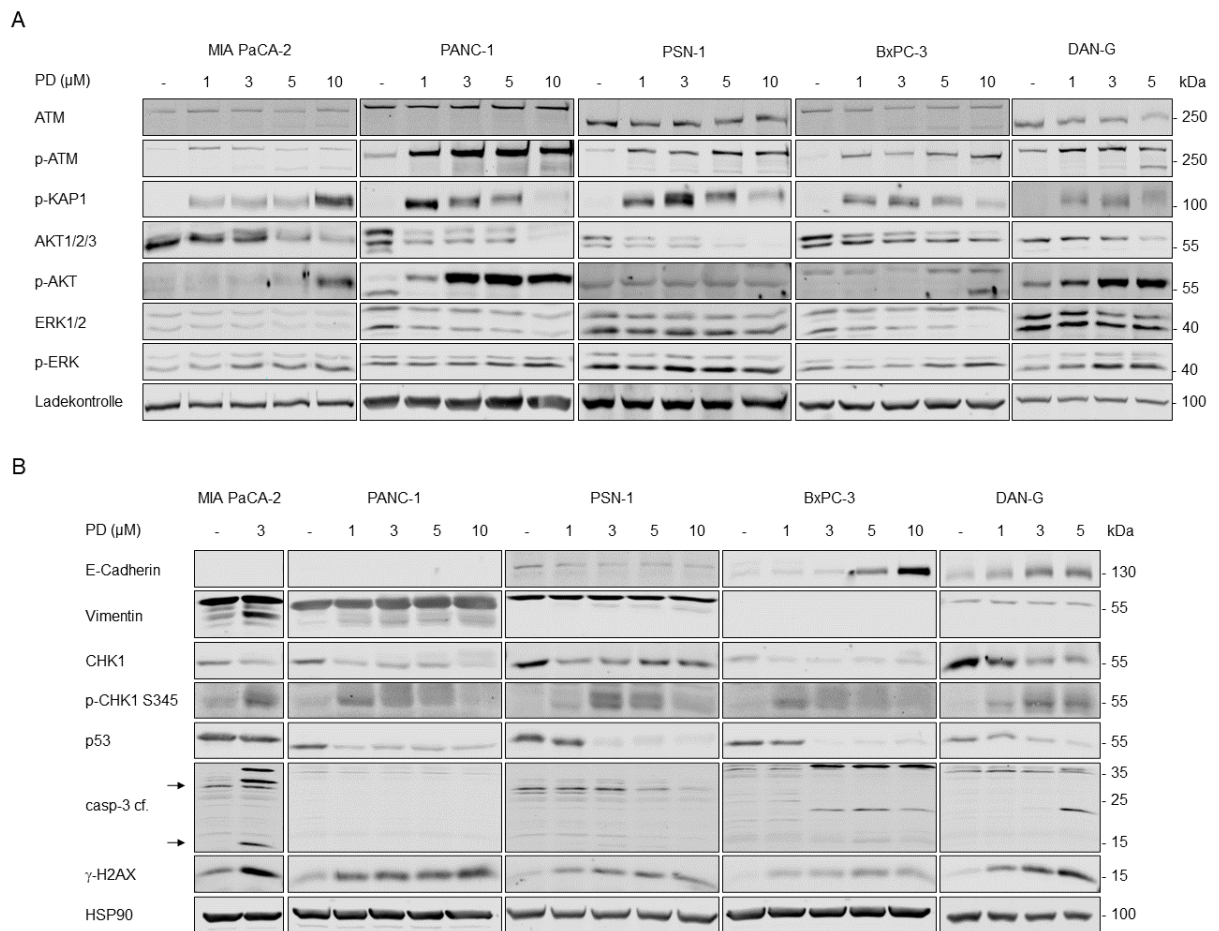


Abbildung 43: PD führt auch in humanen PDAC Zellen zu einer Aktivierung der DNA-Schadensantwort, der PI3K/AKT und der MAPK/ERK Signalwege. (A) Immunoblot von MIA PaCA-2, PANC-1, PSN-1, BxPC-3 und DAN-G zur Detektion von ATM, AKT, ERK, sowie die phosphorylierten Proteine p-ATM, p-KAP1, p-AKT und p-ERK. Dafür wurden die Zellen mit den gezeigten Dosen an PD behandelt und für weitere 24 h inkubiert. Vinculin (MIA PaCA-2) und HSP90 (PANC-1, PSN-1, BxPC-3, DAN-G) wurden als Referenz einer gleichmäßigen Ladung verwendet; $n = 2$, $n > 3$ (MIA PaCA-2). (B) Immunoblot von MIA PaCA-2, PANC-1, PSN-1, BxPC-3 und DAN-G zur Detektion von E-Cadherin, Vimentin, CHK1, p53, Caspase-3, sowie die phosphorylierten Proteine p-CHK1 und γ -H2AX. Die Zellen wurden mit den gezeigten Konzentrationen an PD behandelt und nach 24 h geerntet. HSP90 wurde als Referenz einer gleichmäßigen Ladung verwendet; $n = 2$, $n > 3$ (MIA PaCA-2).

Die humanen PDAC Zelllinien zeigten trotz der unterschiedlichen Subtypen (mes/epi) keinen klaren Phänotyp in Bezug auf die PD-Behandlung, da in allen Zelllinien erfolgreich Apoptose induziert wurde (s. **Abb. 38, 39**). Dieses Ergebnis steht somit klar im Kontrast zu den Resultaten aus den murinen PDAC Zelllinien (s. **Abb. 31, 32**).

5.6. Charakterisierung der biochemischen und zellulären Effekte von PD in Leukämiezellen

5.6.1. Zelltodbestimmung in AML, ALL, CML und Burkitt-Lymphomzelllinien bei PD Behandlung nach 24 h

Da der PP2A-Inhibitor in adhärenenten murinen und humanen PDAC Zellen vielversprechende Ergebnisse zeigte, erfolgte eine Charakterisierung der PD Effekte in Leukämiezellen. Dazu wurde eine AML- (MV4-11), eine ALL- (RS4-11), eine CML- (K562), eine Burkitt Lymphomzelllinie- (RAMOS) und zwei erythroleukämische Zelllinien (HEL, HEL Δ SIAH2) mit PD behandelt und nach 24 h geerntet. Es wurden Dosen von 0.1 – 1 μ M PD verwendet.

Die Zelllinien MV4-11, RS4-11 und die RAMOS zeigten eindeutige Effekte. Mit 1 μ M PD erreichten MV4-11 Zellen eine Gesamtapoptose von 83.9 %. RS4-11 erreichte einen Wert von 64.1 %, während die Totalapoptose der RAMOS Zellen mit 1 μ M PD nur bei 37.6 % betrug. Die Induktion der Apoptose waren sowohl in der frühen als auch in der späten Apoptose/Nekrose in den genannten Zelllinien signifikant (**Abb. 44A-C**). Bei K562, HEL und HEL Δ SIAH2 Zellen erreichte nur die frühe Apoptose eine statistische Relevanz. Außerdem konnte kein Unterschied zwischen dem HEL Wildtyp und dem HEL Δ SIAH2 beobachtet werden (**Abb. 44D-F**). Diese Erkenntnis legte die Vermutung nahe, dass die Funktionen von SIAH2 nicht durch PD beeinflusst werden und das Fehlen von SIAH2 nicht zu einer gesteigerten zytotoxischen Reaktion von PD beiträgt.

Bei dieser dosisabhängigen Zelltodbestimmung in Leukämiezellen konnte bereits festgestellt werden, dass PD in leukämische Zellen effizienter Apoptose induziert als in humane PDAC Zellen (s. **Abb. 38**).

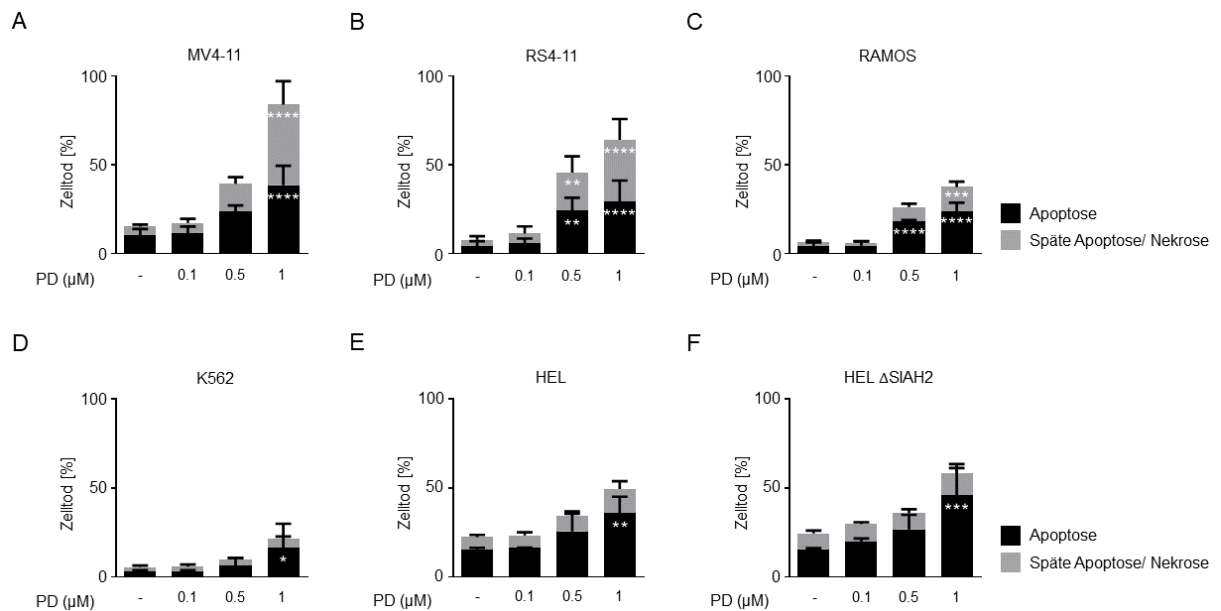


Abbildung 44: **PD führt in allen getesteten Leukämiezellen zur Induktion der Apoptose.** Die Zelllinien (A) MV4-11, (B) RS4-11 wurden mit Dosen von 0.1 – 1 µM PD behandelt und nach 24 h geerntet. Eine FACS Analyse wurde anschließend mit den Annexin-V/PI gefärbten Zellen durchgeführt; $n = 4$. Dieselbe Analyse wurde an der Burkitt Lymphomzelllinie (C) RAMOS; $n = 3$, (D) der CML Zelllinie K562; $n = 3$, (E) der erythroleukämische Zelllinie HEL; $n = 3$ und in (F) HEL Δ SIAH2 durchgeführt; $n = 3$. Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; Statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

5.6.2. Langzeiteffekte von PD in leukämische Zellen

Um Langzeiteffekte in Leukämiezellen zu analysieren, wurden diese mit niedrigen Dosen von 100 nM, 200 nM und 300 nM PD behandelt und für weitere 72 h kultiviert. Für diese Analyse wurden MV4-11, RS4-11 und RAMOS ausgewählt, da die genannten Zelllinien die besten Effekte nach 24 h mit PD zeigten (s. **Abb. 44**).

Nach 24 h konnte die Dosis von 100 nM PD weder in MV4-11 noch in RS4-11 oder in RAMOS Zellen Apoptose induziert werden. Nach 72 h akkumulierte jedoch eine signifikante Anzahl an Zellen sowohl in RS4-11 als auch in RAMOS Zellen in der frühen und späten Apoptose bei der Behandlung mit 100 nM PD.

Die beschriebenen Effekte konnten in beiden Zelllinien mit 200 nM und 300 nM verstärkt werden. MV4-11 Zellen, die nach 24 h die sensitivste Zelllinie war, erreichte erst bei 300 nM PD eine statistische Signifikanz, wobei mehr Zellen in der frühen Apoptose als in der späten Apoptose akkumulierten. Die Gesamtapoptose erreichte bei der höchsten Dosis von 300 nM in MV4-11 einen Wert von 73.6 %, in RS4-11 Zellen wurde ein Wert von 87.3 % verzeichnet und in RAMOS Zellen betrug die Gesamtapoptose 98.4 % (**Abb. 45**).

5. Ergebnisse

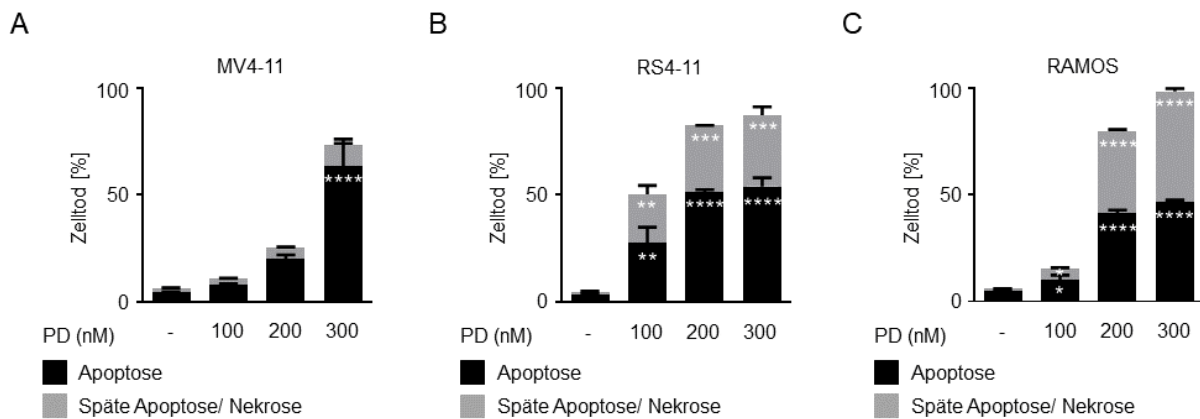


Abbildung 45: PD ist nach 72 h trotz niedriger Dosierung ebenfalls zytotoxisch für leukämische Zellen. (A) MV4-11, (B) RS4-11 und (C) RAMOS Zellen wurden mit 100 nM, 200 nM und 300 nM behandelt und für weitere 72 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend geerntet und mit Annexin-V, sowie PI angefärbt. Der Zelltod wurde durchflusszytometrisch bestimmt; $n = 2$. Alle Daten (A) - (C) sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Somit wurden die Effekte von PD in Leukämiezellen sowohl dosisabhängig als auch zeitabhängig charakterisiert. Dabei wurde festgestellt, dass MV4-11 Zellen nach 24 h die höchste Gesamtapoptose aufwies. In einem zeitabhängigen Verlauf waren die zytotoxischen Effekte von PD jedoch in RAMOS Zellen am besten zu erkennen.

5.7. Charakterisierung von PD in normal proliferierenden Zellen

5.7.1. Dosisabhängige PD-Effekte in RPE-1 Zellen nach 24 h

Der PP2A-Inhibitor PD zeigte im Rahmen dieser Dissertation bisher in allen getesteten mutierten Krebszelllinien vielversprechende Ergebnisse. Um zu gewährleisten, dass diese Effekte nicht auf normale und gesunde Zellen übertragbar sind, wurde nun die epitheliale Retinalpigment Zelllinie RPE-1 mit PD behandelt. Es wurde sowohl eine Zelltodbestimmung als auch eine Analyse von posttranslationalen Modifikationen mittels Immunoblot durchgeführt.

Die Behandlung von PD führte bis zu der höchsten Dosis von 5 μ M PD zu keiner signifikanten Anhäufung von Annexin/PI-positiven Zellen (**Abb. 46A**). In einer Western Blot Analyse zeigte die PD-Behandlung eine Induktion von DNA-Schäden über die Zunahme von p-ATM, p-KAP1 und γ -H2AX. Eine schwache Induktion von p-CHK1 (S345) einhergehend mit einem klaren Verlust von CHK1 konnte außerdem durch die PD-Behandlung nachgewiesen werden (**Abb. 46B**).

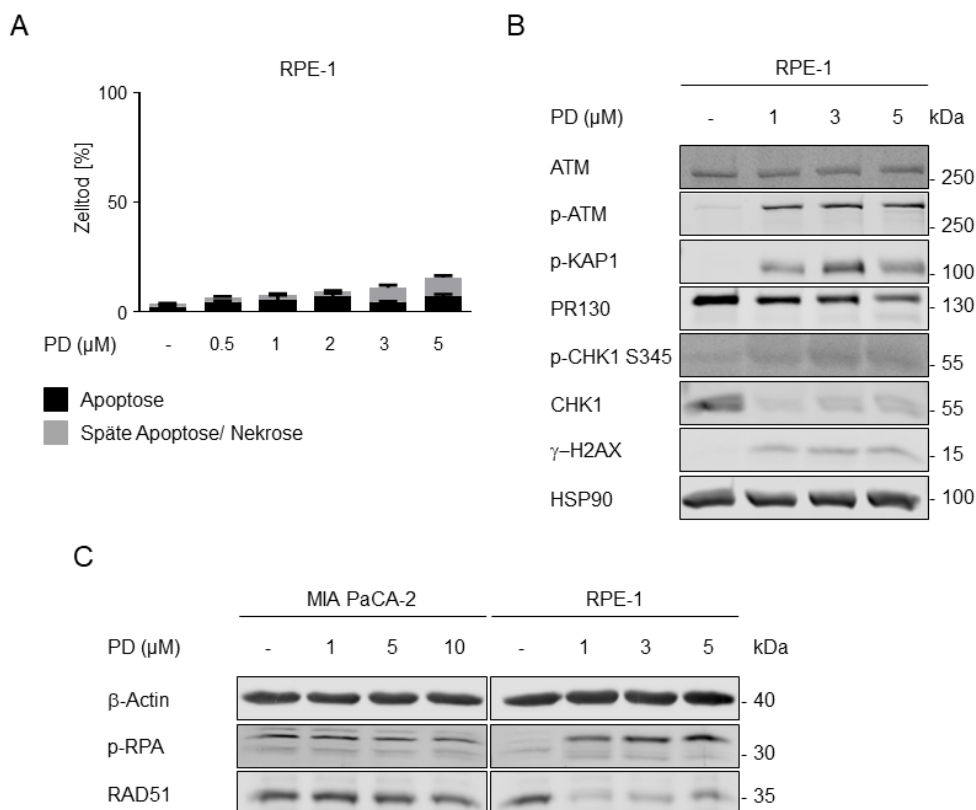


Abbildung 46: Die Behandlung von PD führt bei normalen Körperzellen zu einer Aktivierung der DNA-Schadensantwort, jedoch nicht zur Apoptose. (A) Die epithelialen Retinapigment Zelllinie RPE-1 wurde mit einer Dosisreihe von 0.5 – 10 µM PD behandelt. Die FACS Analyse der Annexin-V/PI gefärbten Zellen wurde 24 h nach der Behandlung durchgeführt; n = 3. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD dargestellt; Statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt. (B) Die mit PD-behandelten RPE-1 Zellen wurden nach 24 h geerntet, lysiert und im Western Blot analysiert. Es wurden ATM, PR130, CHK1, γ-H2AX, sowie die phosphorylierten Proteine p-ATM, p-KAP1 und p-CHK1 detektiert. HSP90 diente als Ladekontrolle; n = 2. (C) Die Effekte von PD wurden in RPE-1 und MIA PaCA-2 Zellen gestellt in direkten Vergleich gestellt. RPE-1 Zellen wurden mit steigender PD Dosis behandelt und nach 24 h geerntet. MIA PaCA-2 Zellen wurden mit 1 – 10 µM PD behandelt und für weitere 24 h kultiviert. Ein Immunoblot wurde durchgeführt, um p-RPA und RAD51 zu detektieren. Die Detektion von β-Actin diente zur Kontrolle der Ladung; n = 2.

Um RPE-1 Zellen im direkten Vergleich zu MIA PaCA-2 Zellen zu stellen, wurden beide Zelllinien mit den angegebenen PD Dosen für 24 h behandelt, lysiert und einer Western Blot Analyse unterzogen. Diese zeigte eine deutliche Abnahme des HR-Proteins RAD51, welche mit einer Zunahme von p-RPA in RPE-1 Zellen einherging. In MIA PaCA-2 blieb der Spiegel von RAD51 und p-RPA bei allen Dosen an PD konsistent (**Abb. 46C**).

Diese Erkenntnis zeigte, dass PD in RPE-1 Zellen ebenfalls DNA-Schäden verursacht, welche jedoch nicht in einer Apoptose enden.

5. Ergebnisse

5.7.2. Dosisabhängige PD-Effekte in PBMCs nach 24 h

Es wurde eine weitere Negativkontrolle durchgeführt, um toxische Effekte in normal proliferierenden Zellen ausschließen zu können. Dafür wurden PBMCs mit PD behandelt. Neutrophile und PMN Zellen gehören zu der Gruppe der weißen Blutkörperchen (Leukozyten), während die dendritischen Zellen antigenpräsentierende Zellen sind und unter anderem für die Aktivierung der T-Zellen verantwortlich sind. T-Zellen wiederum sind für die Erkennung von Antigenen verantwortlich, während die B-Zellen Antikörper bilden und für die adaptive Immunreaktion im menschlichen Körper zuständig ist. Die Monozyten können vom Blut in das Gewebe wandern und dort zu einer Makrophage werden, um Zelltrümmer oder Bakterien zu entfernen.

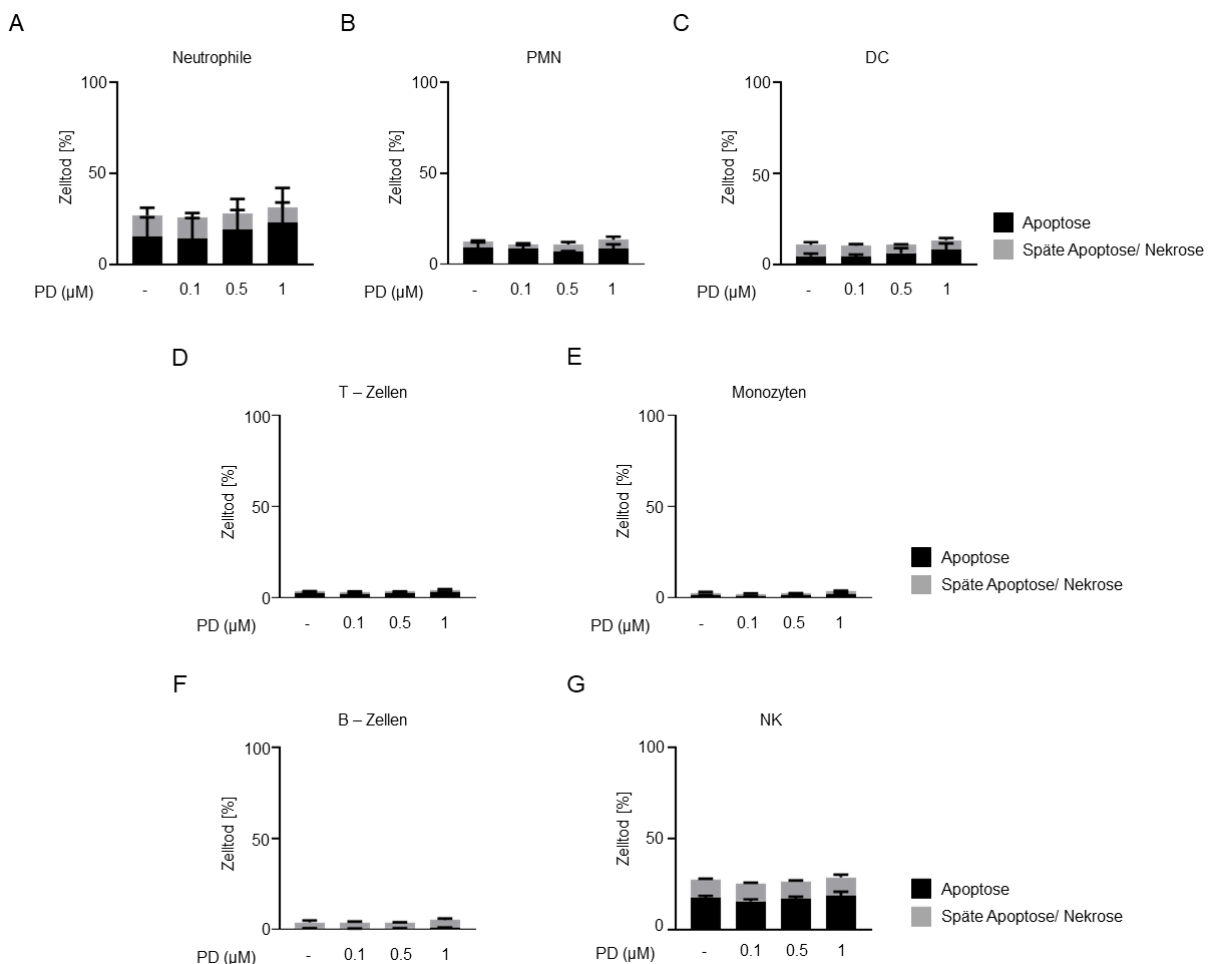


Abbildung 47: **Effekte von PD in PBMC-Populationen.** Die (A) Neutrophile Zellen, (B) die PMN Zellen, (C) die DC Zellen, (D) die T-Zellen, (E) Monozyten, (F) B-Zellen und (G) die NK Zellen wurden mit 0.1 – 1 µM PD behandelt und für weitere 24 h kultiviert. Nach der Ernte wurden die Zellen mit Annexin V-FITC UND SYTOX™ AADvanced™ gefärbt. Der Zelltod wurde im Anschluss durchflusszytometrisch bestimmt; n = 4. Alle Daten (A) - (G) sind angegeben als Mittelwerte ± SD. Eine statistische Analyse mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) ergab keine statistischen Signifikanzen. Diese Daten wurden ausschließlich von Frau Yanira Zeyn im Rahmen einer Korporation mit der AG Grabbe/Bros von der Universitätsmedizin in Mainz durchgeführt. Für eine erhöhte Aussagekraft dieses Projekts, wurden diese in die Dissertation inkludiert.

Da es sich bei allen Zellarten um eine Primärkultur handelte, wurden die Analysen nur für den 24 h Wert durchgeführt. Eine durchflusszytometrische Zelltodbestimmung zeigte, dass PD in keiner der getesteten Zelllinien eine Induktion der Apoptose herbeiführte (**Abb. 47**). Mit dieser Analyse konnte ausgeschlossen werden, dass PD zytotoxisch auf Immunzellen wirkt und die Immunabwehr bei einer Behandlung angreift.

5.8. Die Effekte von PD basieren auf einer spezifischen Reduktion der funktionalen Untereinheit PP2A/PR130

5.8.1. Epitheliale murine PDAC Zelllinien zeigen keine Reduktion von PR130 durch PD

Wie aus **Kapitel 5.4.** hervorging, konnten die murinen PDAC Zelllinien in einen mesenchymalen und einen epithelialen Subtyp unterteilt werden. Dabei stellte sich heraus, dass der mesenchymale Subtyp sensitiv auf PD reagierte, während die epithelialen Subtypen auch bei hohen Dosen und langen Zeitwerten resistent gegenüber PD blieben (s. **Abb. 31, 32**). Um zu analysieren, weshalb diese Phänotypen beobachtet werden konnten, wurden die Untereinheiten von PP2A im Immunoblot untersucht. Dabei wurden drei mesenchymale und drei epitheliale Zelllinien mit 3 μ M PD für 24 h behandelt. Die Zelllinien 3250 und 9591 wurden von Frau Dr. Leydecker kultiviert und in ihrer Dissertation ausführlich analysiert.

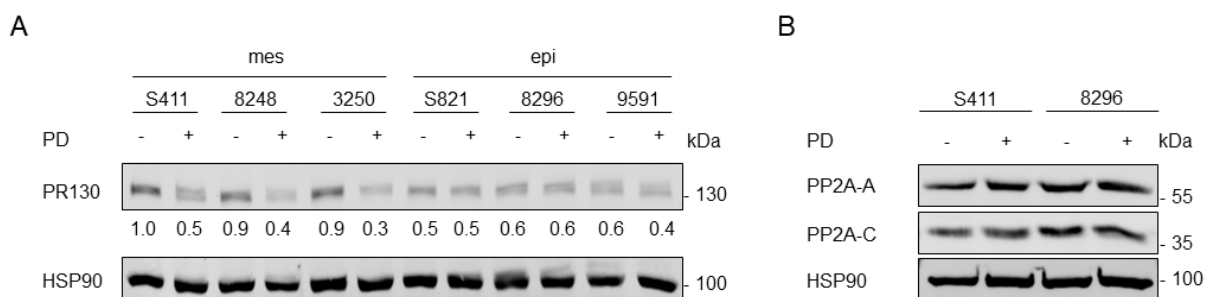


Abbildung 48: Die PD-Behandlung führt in mesenchymalen PDAC Zelllinien zu einer Abnahme des PR130-Spiegels. (A) Mesenchymale and epitheliale murine PDAC Zelllinien wurden mit 3 μ M PD behandelt und für 24 h kultiviert. Die Expression von PR130 wurde mittels Immunoblot nachgewiesen. HSP90 ist die Ladekontrolle; n = 2. Dieses Experiment wurde parallel von Frau Dr. Leydecker durchgeführt und ist ebenfalls in ihre Dissertation zu sehen. Frau Leydecker wurde von mir betreut und in dieses Projekt eingearbeitet. Aufgrund von Überschneidungen im Projekt wurde beschlossen diese Ergebnisse in beide Dissertationen aufzuführen. (B) Die mesenchymalen S411 und die epithelialen 8296 Zellen wurden mit 3 μ M PD behandelt. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen geerntet und die Lysate via Immunoblot analysiert. In beiden Zelllinien wurden jeweils PP2A-A und PP2A-C detektiert; n = 3.

5. Ergebnisse

Der Immunoblot in **Abb. 48A** bestätigte erneut, dass der mesenchymale Subtyp basal bereits einen höheren Spiegel an PR130 aufweist. Durch die Behandlung mit PD wurde PR130 in S411, 8248 und 3250 drastisch vermindert. Im Gegensatz dazu zeigten die epithelialen Zelllinien basal keine hohe PR130 Expression. Diese konnte durch eine PD-Behandlung ebenfalls nicht beeinflusst werden (**Abb. 48A**). Die strukturelle Untereinheit PP2-A und die katalytische Untereinheit PP2A-C wurde weder im mesenchymalen noch im epithelialen Subtyp durch PD moduliert (**Abb. 48B**).

Auch in den humanen PDAC Zelllinien wurde die PR130 Expression nach einer PD Behandlung analysiert. Alle getesteten Zelllinien zeigten analog zu den murinen PDAC Zellen eine Reduktion von PR130 mit zunehmender PD Konzentration. Dabei konnte festgestellt werden, dass PANC-1 und BxPC-3 das PR130 basal am stärksten exprimieren (**Abb. 49**).

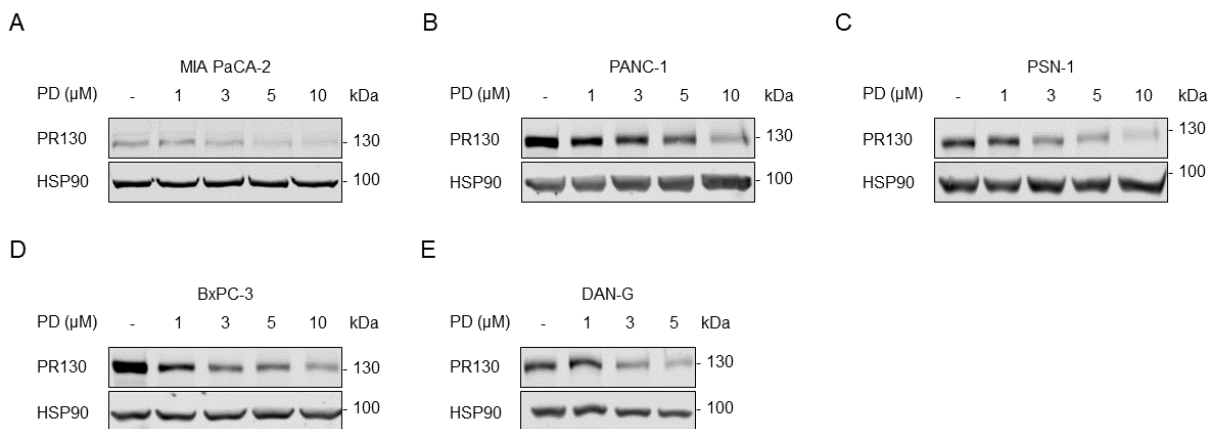


Abbildung 49: Die Behandlung der humanen PDAC Zelllinien mit PD führt zu einer Reduktion bis hin zum Verlust von PR130. Die Zelllinien (A) MIA PaCA-2, (B) PANC-1, (C) PSN-1, (D) BxPC-3 und (E) DAN-G wurden mit einer Dosisreihe von 1 – 10 µM PD behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und lysiert. Ein Immunoblot wurde durchgeführt, um die Reduktion von PR130 in allen getesteten Zelllinien zu belegen; n = 2.

5.8.2. Chloroquin kann den PD-bedingten Abbau von PR130 nicht entgegenwirken

Im nächsten wurde überprüft nach welchem Mechanismus PR130 durch die Behandlung mit PD abgebaut wird. Es konnte anhand einer Western Blot Analyse gezeigt werden, dass PD nicht nur eine Apoptose, sondern auch eine Autophagie in MIA PaCA-2 Zellen, induzierte (**Anhang 3A**). Die Induktion der Autophagie wurde durch eine Induktion von LC3B [309-311] und einer Reduktion von p62 [312, 313] belegt. MIA PaCA-2 Zellen wurden nun mit dem Autophagie Inhibitor Chloroquin in Kombination mit PD behandelt. Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, lysiert und auf einem Gel aufgetragen. Eine Detektion von PR130 zeigte erneut die Reduktion dieses Proteins in MIA PaCA-2 Zellen durch PD. In der Chloroquin Einzelbehandlung blieb der Spiegel an PR130 vergleichbar zu Kontrolle. Die Kombination dieser beiden Inhibitoren zeigte jedoch erneut einen Abbau von PR130 (**Abb. 50A**).

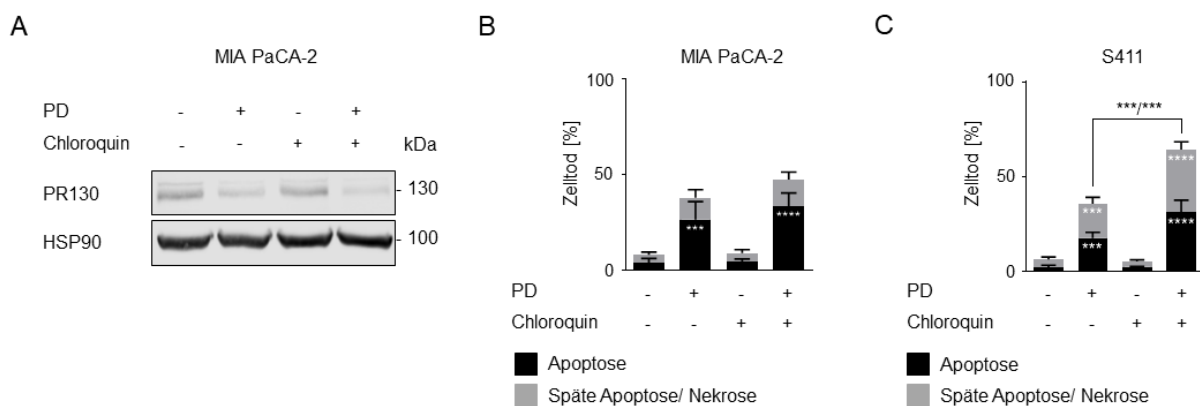


Abbildung 50: Die Hemmung der Autophagie steigert die zytotoxischen Effekte von PD in PDAC Zellen. (A) MIA PaCA-2 Zellen wurden mit 3 μ M PD und 50 μ M Chloroquin behandelt. Ein Immunoblot wurde durchgeführt, um PR130 zu detektieren. HSP90 diente als Ladekontrolle; $n = 3$. **(B)** MIA PaCA-2 Zellen wurden mit 3 μ M PD und 10 μ M Chloroquin behandelt und nach 24 h geerntet. FACS Analysen wurden durchgeführt, um Annexin-V/PI positive Zellen zu detektieren; $n = 3$. **(C)** Die murine PDAC Zelllinie S411 wurde für 24 h mit 2 μ M PD und 10 μ M Chloroquin inkubiert. Die Zellen wurden nach Beendigung der Inkubationszeit geerntet, mit Annexin/PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert; $n = 3$. Die Daten aus (B) und (C) werden als Mittelwerte \pm SD dargestellt; Statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Anschließend wurde eine Zelltodbestimmung durchgeführt. Dafür wurden MIA PaCA-2 Zellen mit 3 μ M PD und 10 μ M Chloroquin behandelt. Nach 24 h induzierte PD, sowohl in der Einzelbehandlung als auch in der Kombination mit Chloroquin, signifikant die Apoptose in den behandelten Zellen. Chloroquin zeigte in der Einzelbehandlung in MIA PaCA-2 Zellen keine nennenswerten Effekte.

5. Ergebnisse

Es wurde festgestellt, dass die Kombination PD + Chloroquin tendenziell zu einer höheren Apoptoserate führt als PD allein. Dennoch erreichte dieser Unterschied keine statistische Relevanz (**Abb. 50B**).

Um die Effekte deutlicher zeigen zu können, wurde die mesenchymale murine Zelllinie S411 mit 2 μM PD und 10 μM Chloroquin inkubiert. Nach 24 h akkumulierte eine signifikante Anzahl an Zellen in der frühen und späten Apoptose, sowohl in der PD Einzelbehandlung als auch in der Kombination mit Chloroquin. Chloroquin allein zeigte keine zytotoxischen Effekte in dieser Zelllinie. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Apoptoserate in der Kombination PD + Chloroquin signifikant höher war als in der PD Einzelbehandlung (**Abb. 50C**).

Die FACS Analyse zusammen mit dem Immunoblot aus der **Abb. 50** lassen darauf schließen, dass der Abbau von PR130 unabhängig von der lysosomalen Autophagie abläuft.

5.8.3. Der PD-bedingte Abbau von PR130 erfolgt über das Proteasom

Ergänzend zu den Ergebnissen aus **Abb. 50**, wurden MIA-PACA-2-Zellen mit dem spezifischen proteasomalen Inhibitor Lactacystin und dem PP2Ai PD für 24 h inkubiert. Anschließend wurden Immunoblots und FACS-Messungen durchgeführt.

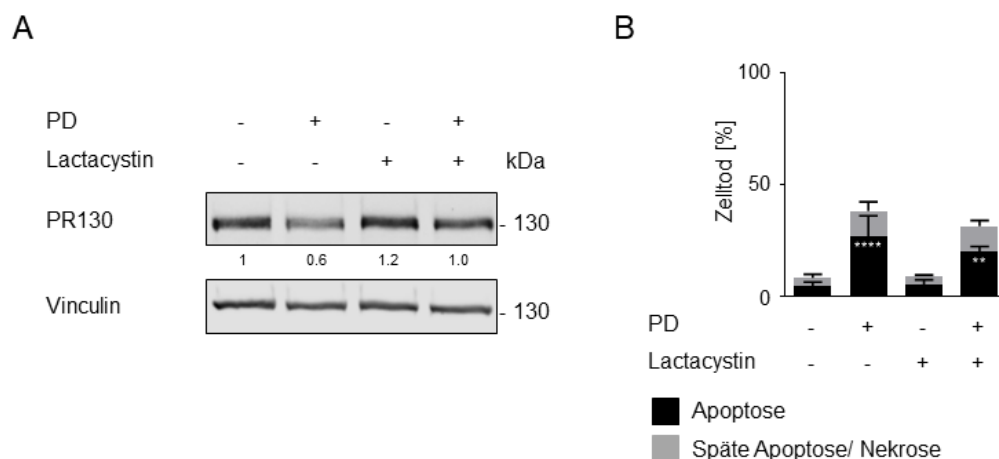


Abbildung 51: Der PD-bedingte Abbau von PR130 wird durch die Behandlung mit Lactacystin gehemmt. (A) MIA PaCA-2 Zellen wurden mit 3 μM PD und 50 μM Lactacystin behandelt. Die Ernte erfolgte nach 24 h Inkubationszeit. Die Durchführung eines Immunoblots diente zur Detektion von PR130. Vinculin diente zur Ladekontrolle; $n = 3$. **(B)** Durchflusszytometrische Analyse von MIA PaCA-2 Zellen, die für 24 h mit 3 μM PD und 10 μM Lactacystin behandelt wurden. Eine anschließende Färbung mit Annexin-V und PI erlaubt die Detektion von Zellen in Apoptose; $n = 3$. Die Daten werden als Mittelwerte \pm SD gezeigt; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$).

Nach 24 h zeigte der Immunoblot, dass Lactacystin die PD bedingte Reduktion von PR130 abschwächt (**Abb. 51A**). Eine anschließende Zellzyklusanalyse mit 10 μM Lactacystin und 3 μM PD in MIA PaCA-2 Zellen ergab eine signifikante Induktion der Apoptose, sowohl in der PD Einzelbehandlung als auch in Kombination mit Lactacystin. Es zeigte sich ein Trend, dass die Kombination PD + Lactacystin eine geringere Apoptoserate induzierte. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (**Abb. 51B**). Aus diesen Erkenntnissen konnte geschlossen werden, dass PD nicht nur eine Apoptose, sondern auch einen proteasomalen Abbau von PR130 auslöst.

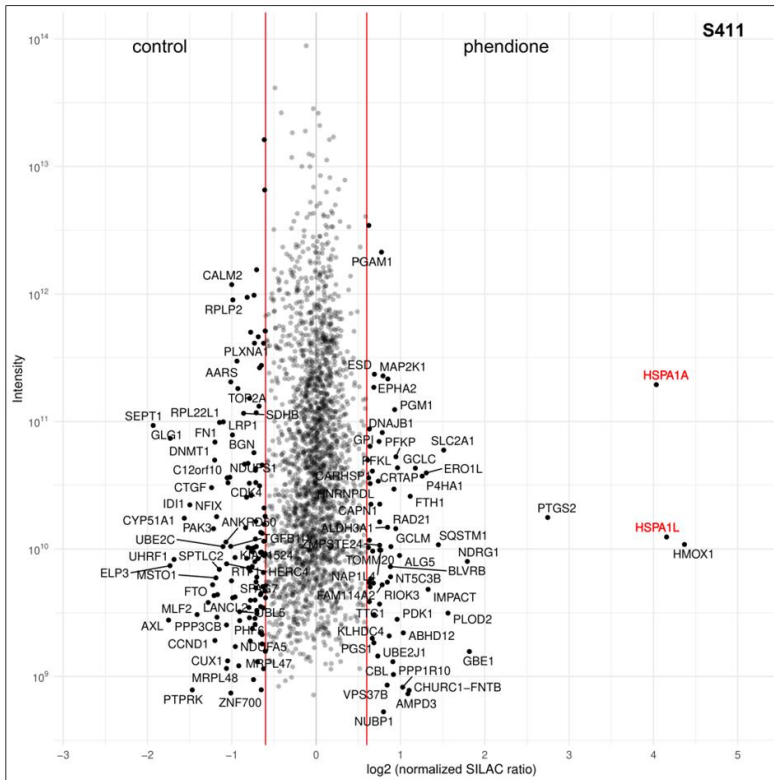
5.8.4. Die PD-Behandlung führt zu einer Induktion von HSP70 im mesenchymalen Subtyp

Die **Kapiteln 5.4. – 5.5. und 5.8.3.** zeigten, dass der proteasomale Abbau von PR130 zytotoxisch für die getesteten PDAC Zelllinien waren. Um die molekularen Mechanismen besser verstehen zu können, die verantwortlich sind für die unterschiedlichen Reaktionen des mesenchymalen und epithelialen Subtyps, wurde eine Proteom Analyse durchgeführt. Da die murinen PDAC Zelllinien klare PD abhängige Phänotypen hervorbrachte, wurden diese für diese Analyse ausgewählt. Dafür wurden S411 und 8296 Zellen zwei Wochen in der Zellkultur mit stabilen Aminosäuren-Isotopen markiert (s. **Kap. 4.5.**). Anschließend wurden beide Zelllinien mit 2 μM PD für 24 h behandelt und für eine Proteom Analyse vorbereitet. Mit der Konzentration von 2 μM konnte gewährleistet werden, dass die PD-sensitiven S411 noch nicht zu stark apoptotisch waren, welches eine anschließende Analyse ausgeschlossen hätte.

Die Proteom Analyse zeigte eine spezifische Induktion von HSPA1A und HSPA1L. Diese Induktion war in S411 Zellen sehr stark ausgeprägt, während 8296 Zellen nur eine leichte Induktion von HSPA1A bei der gleichen Dosis zeigte. HSPA1A kodiert für das Hitzeschockprotein HSP70 (**Abb. 52A-B**).

5. Ergebnisse

A



B

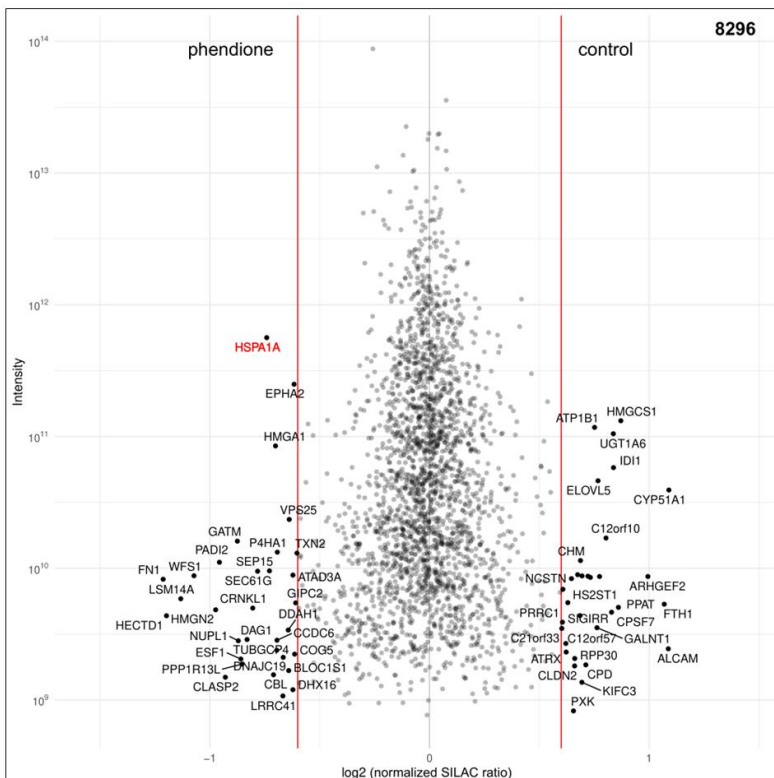


Abbildung 52: Die PD-Behandlung von PDAC Zellen führt zu einer Induktion des Hitzeschockproteins HSP70. Die (A) PD sensitive Zelllinie S411 und (B) die PD resistente Zelllinie 8296 wurden mit stabilen Aminosäure-Isotopen in Zellkulturmedien (SILAC) markiert. Die Zellen wurden nach abgeschlossener Markierung mit $2 \mu\text{M}$ PD für 24 h behandelt. Das daraus resultierende globale Proteinmuster der PDAC Zelllinien wurden mittels Proteomanalyse ausgewertet und wird hier dargestellt (control = Kontrolle, phendione = PD).

Zur Verifizierung der Proteom Analyse, wurden Immunoblots durchgeführt, um HSP70 zu detektieren. Dafür wurden die mesenchymalen und die epithelialen Zelllinien mit 3 μ M PD für 24 h behandelt. Das Ergebnis bestätigte die Proteom Analyse, denn nur die mesenchymalen Zelllinien zeigten eine starke Induktion von HSP70 bei der Behandlung mit PD. Epitheliale 9591 Zellen exprimierten im Grundzustand mehr HSP70 als alle anderen Zelllinien. Dennoch wurde der HSP70 Spiegel auch in diesen Zellen nicht durch die Behandlung mit PD beeinflusst (**Abb. 53A**).

Um zu erfahren, nach welchem Zeitwert HSP70 in den mesenchymalen Zellen induziert wird, wurde ein Immunoblot nach kurzen Zeitwerten durchgeführt. Dafür wurden S411 und 8296 Zellen mit 3 μ M PD behandelt und nach 1h, 3h und 6h geerntet. Das Ergebnis des Immunoblots zeigte bereits nach 6 h eine starke Induktion von HSP70 durch PD in S411 Zellen (**Abb. 53B**). Laut der Zelltodbestimmung der S411 Zellen kam es nach 6 h noch zu keiner signifikanten Induktion der Apoptose. Diese erfolgte erst nach 8 h (s. **Abb. 33**). Somit lag die Vermutung nahe, dass eine HSP70 Induktion ebenfalls maßgeblich zu der Induktion der Apoptose im mesenchymalen Subtyp beiträgt.

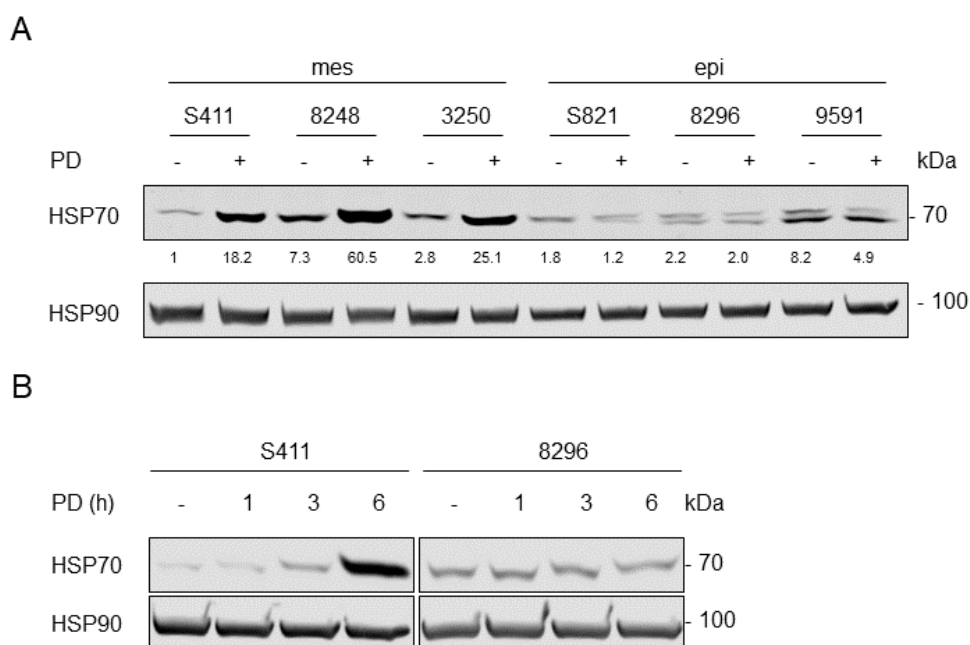


Abbildung 53: Die PD-Behandlung der murinen PDAC Zellen führt zu einer HSP70 Induktion im mesenchymalen Subtyp. (A) Jeweils drei mesenchymale und 3 epitheliale Zelllinien wurden mit 2 μ M PD behandelt und nach 24 h geerntet. Ein Immunoblot wurde durchgeführt, um HSP70 zu detektieren. HSP90 dient als Ladekontrolle; $n = 2$. Dieses Experiment wurde parallel von Frau Dr. Leydecker durchgeführt und ist ebenfalls in ihre Dissertation zu sehen. Frau Leydecker wurde von mir betreut und in dieses Projekt eingearbeitet. **(B)** Die mesenchymale Zelllinie S411 und die epitheliale Zelllinie 8296 wurden mit 3 μ M PD behandelt und nach 1 h, 3 h und 6 h geerntet. HSP70 wurde im Immunoblot anschließend detektiert. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Ladung wurde HSP90 detektiert; $n = 3$.

5. Ergebnisse

5.8.5. MIA PaCA-2 Zellen induzieren HSP70 bei Behandlung mit PD

Es wurde nun überprüft, ob die beobachteten Effekte aus den murinen PDAC Zellen auch auf humane Zellen übertragbar waren. Dafür wurden MIA PaCA-2 Zellen mit einer Dosisreihe von 1 – 10 μM PD behandelt und nach 24 h geerntet.

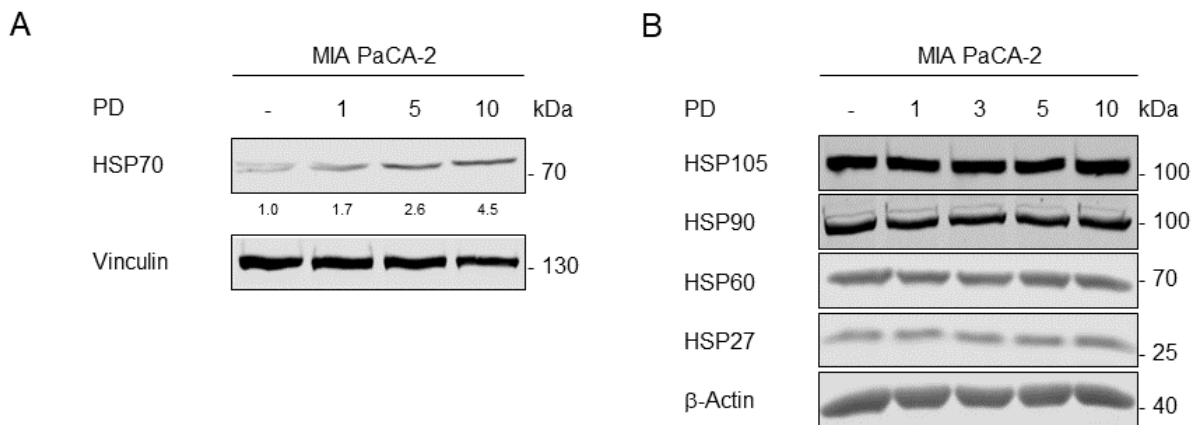


Abbildung 54: In MIA PaCA-2 Zellen führt eine PD-Behandlung ebenfalls zur HSP70 Induktion. (A) MIA PaCA-2 Zellen wurden mit 1 μM , 5 μM und 10 μM PD behandelt und für weitere 24 h kultiviert. Nach der Ernte wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot Analyse untersucht. HSP70 wurde detektiert. Vinculin dient als Ladekontrolle. (B) MIA PaCA-2 Zellen wurden mit steigender PD Dosis behandelt (1 – 10 μM). Ein Immunoblot wurde durchgeführt, um Hitzeschockproteine wie HSP105, HSP60 und HSP27 zu detektieren. HSP90 und β -Actin dienen zur Ladekontrolle; $n = 3$.

Eine Detektion von HSP70 zeigte auch in MIA PaCA-2 Zellen eine dosisabhängige Induktion dieses Proteins (**Abb. 54A**). Es konnte wahrgenommen werden, dass die HSP70 Induktion in der humanen Zelllinie MIA PaCA-2 schwächer ausfiel als in den mesenchymalen murinen PDAC Zelllinien (s. **Abb. 53A**). HSP70 wurde darüber hinaus auch in den anderen humanen Zelllinien PANC-1, PSN-1, BxPC-3 und DAN-G durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass die Induktion von HSP70 in keines der aufgeführten Zelllinien so deutlich war, wie in den MIA PaCA-2 Zellen (**Anhang 4**). Somit konnte für die humanen PDAC Zelllinien kein klarer Phänotyp festgestellt werden.

Des Weiteren wurde überprüft, ob andere HSPs ebenfalls durch eine PD Behandlung beeinflusst wurden. Das Ergebnis im Immunoblot zeigte keine Veränderungen in der Expression von HSP105, HSP60 und HSP27 durch PD im Vergleich zur Kontrolle (**Abb. 53B**). Dieses Resultat stand ebenfalls im Einklang mit der Proteom Analyse, da diese eine spezifische HSP70 Induktion durch PD zeigte (s. **Abb. 52A**).

Diese Daten weisen darauf hin, dass die HSP70 Induktion sowohl in den murinen als auch in humanen PDAC Zellen spezifisch ist. Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen einer HSP70 Akkumulation und einer PR130 Reduktion in PD-behandelten Zellen festgestellt werden.

5.8.6. Die Kombination von PD und einem HSP70-Inhibitor zeigen synergistische Effekte in den getesteten PDAC Zelllinien

Es wurde bereits gezeigt, dass nicht nur PR130, sondern auch HSP70 eine bedeutende Rolle in den PD behandelten PDAC Zellen übernehmen.

Um die biologische Rolle von HSP70 zu analysieren, wurde im nächsten Schritt der PP2A-Inhibitor PD mit dem HSP70-Inhibitor JG-98 kombiniert. Eine Zelltod Analyse wurde für S411, 8296 und MIA PaCA-2 Zellen durchgeführt. Nach 24 h zeigte JG-98 in der Einzelbehandlung in keiner Zelllinie eine Induktion der Apoptose, was eine unspezifische Toxizität dieser Substanz ausschließt. PD induzierte wie erwartet in S411 und MIA PaCA-2 Zellen eine Akkumulation von Zellen in der frühen und späten Apoptose.

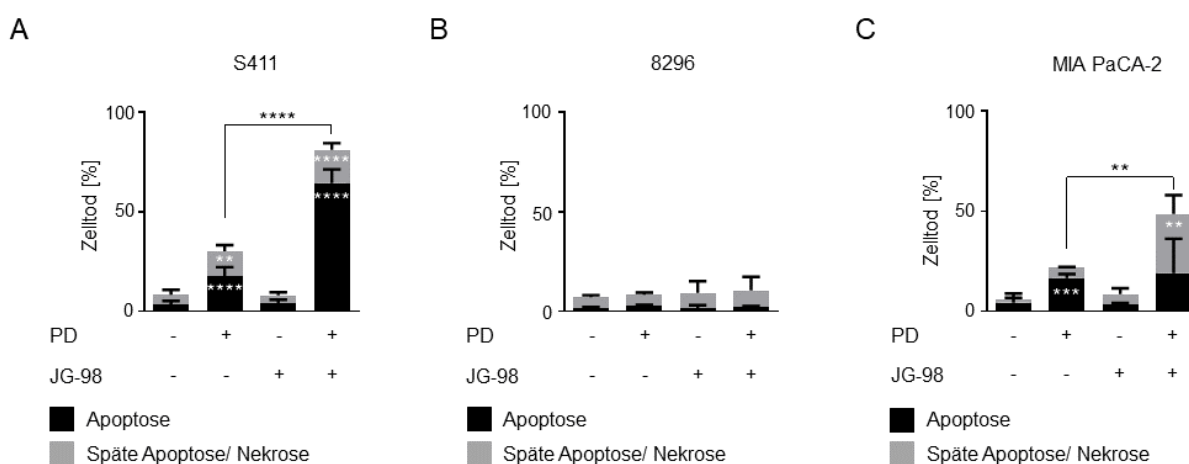


Abbildung 55: Die Inhibition von HSP70 verstärkt die apoptotische Wirkung von PD. (A) Die mesenchymale murine PDAC Zelllinie S411 und (B) epitheliale murine PDAC Zelllinie 8296 wurden mit 2 μ M PD und 0.5 μ M des HSP70-Inhibitors JG-98 für 24 h inkubiert. Die Apoptose wurde mittels Durchflusszytometrie unter der Verwendung der Annexin-V/PI-Färbung ermittelt; $n = 3$. (C) Die humane PDAC Zelllinie MIA PaCA-2 wurden 24 h mit 3 μ M PD und 0.5 μ M JG-98 inkubiert. Eine anschließende durchflusszytometrische Analyse von Annexin/PI gefärbten Zellen ermittelt die Apoptoserate dieser Zellen; $n = 3$. Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Eine Kombination aus PD + JG-98 zeigte synergistische Effekte in S411 und MIA PaCA-2 Zellen. Bei S411 Zellen erreichte die Gesamtapoptose bei der Kombinationsbehandlung einen Wert von 81.2 %, in MIA PaCA-2 Zellen stieg diese von 21.7 % (PD) auf 48.6 % (PD + JG-98) an. Der Unterschied war in S411 stärker als in MIA PaCA-2 Zellen. Trotzdem wurde in beiden Zelllinien eine statistische Signifikanz erreicht (**Abb. 55**). Die epithelialen 8296 Zellen zeigten im Gegensatz zu den S411 und MIA PaCA-2 Zellen keine nennenswerten Effekte mit PD oder JG-98 (**Abb. 55B**). Diese Effekte waren zu erwarten, da der epitheliale Subtyp keine Induktion von HSP70 bei einer PD-Behandlung zeigte (**s. Abb. 52B, 53**).

5.8.7. Die Behandlung mit PD führt in PDAC Zellen zur Entstehung von zytotoxischen Proteinaggregaten

HSP70 übernimmt als molekulares Chaperon eine zentrale Rolle in der Proteinbiosynthese, in dem eine korrekte Faltung von neu synthetisierten Proteinen überwacht. Dabei kann HSP70 an seine Proteinsubstrate binden und sie vor einer Denaturierung oder einer Aggregatbildung schützen. Darüber hinaus kann das HSP70-assoziierte System, Proteine zum Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Abbau steuern und zytotoxische Proteinaggregate auflösen, die bei beeinträchtigter Proteinsynthese und -stabilität entstehen [327, 421, 446]. Eine Studie von 2008 zeigte, dass Vimentin als einen Marker für Aggregate verwendet werden kann. Es wurde gezeigt, dass Vimentin käfigartige und kugelförmige Strukturen um Zellkörper bilden, wenn Aggregate gebildet werden [447]. Um dies zu testen, wurde Vimentin mikroskopisch untersucht. Da Ubiquitin die fehlgefalteten Proteine markiert [448] und somit eine zentrale Rolle beim proteasomalen Abbau von Proteinen übernimmt, wurde auch dieses Protein mikroskopisch untersucht.

Die MIA PaCA-2 Zellen wurden mit 3 μ M PD behandelt und für weitere 24 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern für Ubiquitin und Vimentin angefärbt und anschließend für eine Messung am Mikroskop vorbereitet (**Kapitel 4.4.**). Die Ergebnisse zeigten, dass sich in PD-behandelten MIA PaCA-2 Zellen Ubiquitin Foci bildeten. Diese befanden sich sowohl innerhalb als auch außerhalb des Nukleus (**Abb. 56A**). Eine Quantifizierung bestätigte die signifikante Zunahme der Ubiquitin Focis in PD-behandelten Zellen (**Abb. 56B**).

Vimentin zeigte sich bei einer PD-Behandlung als kugelförmige Struktur, die entweder den Zellkörper einschlossen oder am Rand als Blase lokalisiert war (**Abb. 56A**). Außerdem konnte noch eine klare Zunahme der Farbintensität von Vimentin im Vergleich zu der Kontrollprobe wahrgenommen werden. Dieser Unterschied erwies sich in einer quantitativen Analyse als statistisch signifikant (**Abb. 56C**). Durch den Immunoblot aus **Abb. 43**, konnte die Zunahme der Intensität, aufgrund einer erhöhten Expression von Vimentin, ausgeschlossen werden.

Um die Beobachtungen aus den mikroskopischen Analysen zu verifizieren und die Aggregatbildung zu quantifizieren, wurden MIA PaCA-2 Zellen mit PD behandelt und durchflusszytometrisch analysiert. In **Abb. 56D** ist eine beispielhafte Messung für die Detektion von Aggresomen gezeigt.

Durch die PD bedingte Bildung von Aggregaten nimmt die Kurve eine flachere Form an und verschiebt sich nach rechts. Eine Quantifizierung der FACS Messungen ergab eine signifikante Aggregatbildung in MIA PaCA-2 Zellen nach 48 h PD-Behandlung (**Abb. 56E**). Diese Daten lassen vermuten, dass die Akkumulation von Proteinaggregaten in PD-behandelten Zellen mit der Anreicherung von HSP70 zusammenhängt.

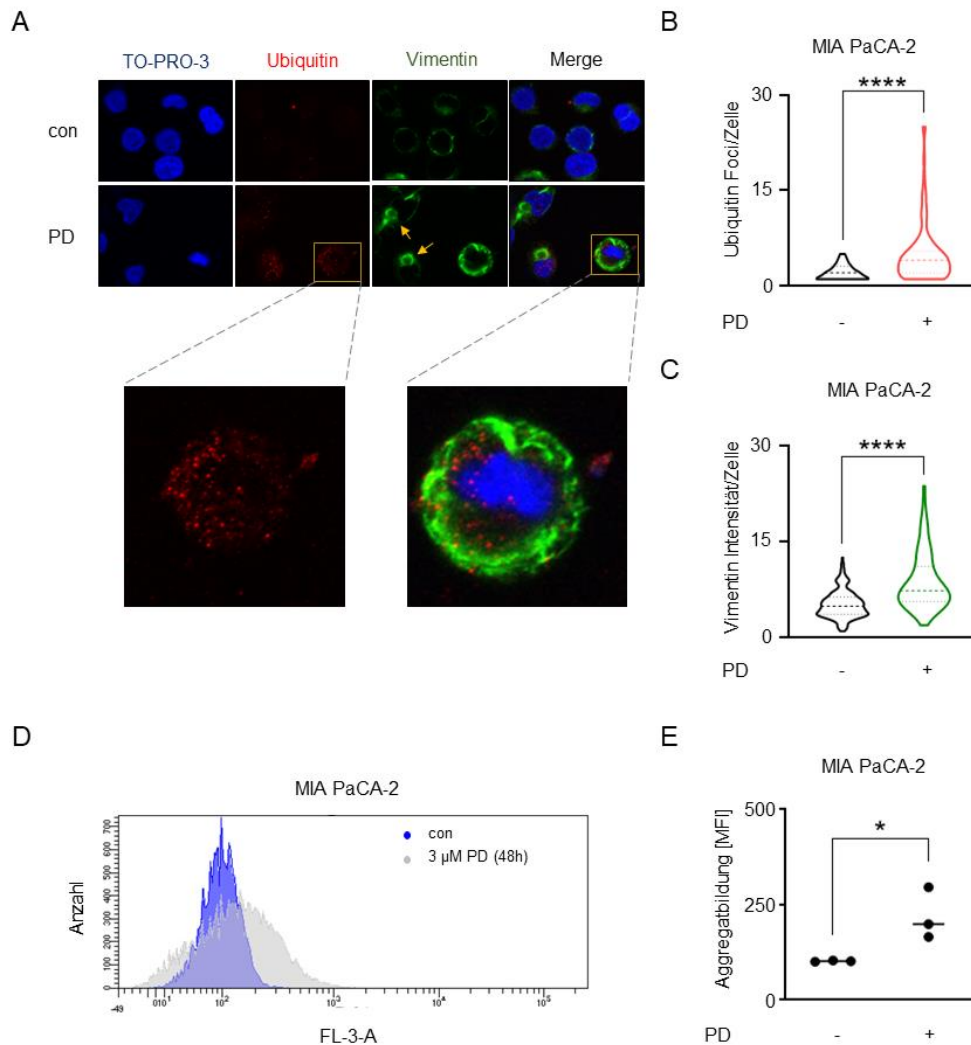


Abbildung 56: Mikroskopische Detektion von Ubiquitin, Vimentin sowie der zytotoxischen Proteinaggregate in MIA PaCA-2 Zellen. (A) MIA-PACA-2-Zellen waren entweder unbehandelt (con) oder wurden 24 h mit 3 μ M PD behandelt, fixiert und mit anti-Vimentin- oder anti-Ubiquitin-Antikörpern inkubiert. Zur Detektion wurden an Alexa Fluor-488 (grün, Vimentin) und Cy3 (rot, Ubiquitin) gekoppelte Antikörper verwendet. Zur Darstellung der Zellkerne wurde TO-PRO3 eingesetzt. Gezeigt werden repräsentative Bilder; $n = 3$. Die Analyse der Vimentinintensität pro Zelle und der Ubiquitin-Foci pro Zelle wurde mit der Software ImageJ durchgeführt. Die Maßstabsleiste beträgt 10 μ m. (B) Quantifizierung von Ubiquitin Foci in PD-behandelten MIA-PACA-2-Zellen. Die Daten wurden durch Zählen von 100 Zellen in jedem von den 3 unabhängigen Durchläufen erhoben. (C) Quantifizierung der Vimentinintensität in PD-behandelten MIA-PaCA-2-Zellen. Die Daten wurden durch Messung von 100 Zellen in jedem von 3 unabhängigen Durchläufen erhoben. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD angegeben, statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (one-way ANOVA) wurden durchgeführt (**** $p < 0,0001$). (D) MIA-PACA-2-Zellen wurden ausgesät und für 48 h mit 3 μ M PD inkubiert. Die Zellen wurden anschließend geerntet und mit dem Aggresom-Detektionskit analysiert (con = unbehandelte Zellen). Die Daten wurden durchflusszytometrisch erfasst; $n = 3$. (E) Quantifizierung der Daten aus (A). Die Daten wurden mit Hilfe einer Varianzanalyse (one-way ANOVA) statistisch ausgewertet (* $p < 0,05$).

5. Ergebnisse

5.8.8. Die Ausschaltung von PR130 steigert die Apoptose und begünstigt die Bildung der zytotoxischen Proteinaggregate in PDAC Zellen

Um sicher zu stellen, dass die bisher beschriebenen Effekte tatsächlich auf die funktionell relevante Rolle von PR130 basieren, wurde eine *knockdown* von PR130 durchgeführt (**Kapitel 4.1.6.**). Das PPP2R3A Gen, welches für PR130 kodiert, wurde mit einer siRNA in MIA PaCA-2 Zellen ausgeschaltet. Die Zellen wurden anschließend mit PD behandelt. Eine Zelltodbestimmung zeigte, eine signifikante Induktion der Apoptose in Zellen, die mit der Kontroll-siRNA behandelt wurden. Dieses Ergebnis war vergleichbar mit den Ergebnissen aus **Abb. 38B**. Zellen, in denen PPP2R3A ausgeschaltet wurde, zeigten ebenfalls eine klare Induktion der Apoptose bei einer PD-Behandlung. Die Apoptoserate in PR130-*knockdown* Zellen war signifikant höher als in Zellen mit PR130 (**Abb. 57A**). Um den *knockdown* zu verifizieren, wurde ein Immunoblot unter den gleichen Testbedingungen durchgeführt.

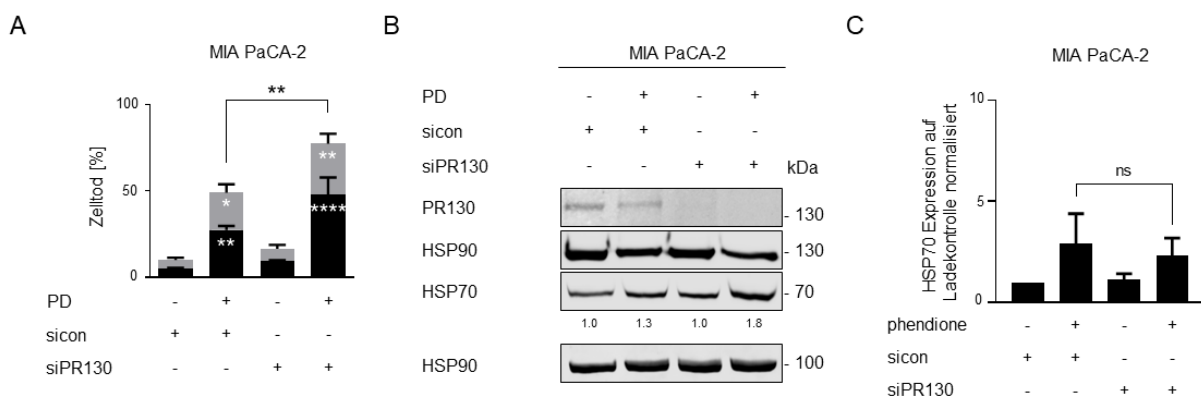


Abbildung 57: Ein Knockdown von PR130 erhöht den zytotoxischen Effekt von PD in der humanen PDAC Zelllinie MIA PaCA-2. (A) MIA PaCA-2-Zellen wurden zweimal innerhalb von 48 h mit 30 pM der angegebenen siRNA transfiziert (sicon = Kontroll-siRNA; siPR130, siRNA gegen PR130). Nach zwei Tagen wurden die Zellen zusätzlich mit 3 μ M PD für weitere 48 h inkubiert. Der Zelltod wurde mittels Durchflusszytometrie und Annexin-V/PI-Färbung analysiert; $n = 3$. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$). (B) Die siRNA-Transfektion wurde wie unter (A) beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden für weitere 24 h mit 3 μ M PD behandelt und ein Immunoblot wurde zum Nachweis von PR130 und HSP70 durchgeführt. HSP90 diente als Ladekontrolle; $n = 4$. (C) Quantifizierung der HSP70-Expression und Normalisierung auf die Ladekontrolle von 4 unabhängigen Immunoblots aus (B); $n = 4$. Eine durchgeführte Varianzanalyse (one-way ANOVA) ergab keine statistischen Veränderungen zwischen den unterschiedlichen Bedingungen.

Die Detektion von PR130 zeigte erneut den PD bedingten Abbau von PR130. Die PD-Behandlung allein reichte jedoch nicht aus, um PR130 vollständig zu eliminieren. Durch die Transfektion der MIA PaCA-2 Zellen mit einer siRNA gegen PPP2R3A konnte die Expression von PR130 vollständig unterdrückt werden. Die Detektion von HSP70, in PR130-*knockdown* Zellen und in Zellen mit PR130, zeigte in dieser Western Blot Analyse ein unklares Verhalten. Daher wurde die HSP70 Induktion ausgemessen und quantifiziert.

Die Quantifizierung zeigte, dass Zellen mit und ohne PR130 gleichermaßen HSP70 induzieren, wobei die Induktion von HSP70 in Zellen ohne PR130 tendenziell geringer war (**Abb. 57B, C**).

Die Transfektion von siPPP2R3A wurde ebenfalls in den murinen PDAC Zelllinien durchgeführt. Dafür wurden die mesenchymale Zelllinie S411 und die epitheliale Zelllinie S821 verwendet. Für die Transfektion wurde eine murine siRNA gegen Ppp2r3a verwendet. S411 Zellen wurden aufgrund ihrer hohen Sensitivität gegenüber PD nur mit 2 μ M behandelt (s. **Abb. 31A**). S821 Zellen wurden standardmäßig mit 3 μ M PD behandelt. Durch die Behandlung mit PD nahm die Apoptose in S411 Zellen zu. Dabei war die Apoptoserate in Zellen ohne PR130 signifikant höher als in Zellen mit PR130. Dieses Ergebnis war vergleichbar mit den Ergebnissen aus den MIA PaCA-2 Zellen. In S821 Zellen führte der *knockdown* von PR130 zu keiner Sensibilisierung gegenüber PD. Der *knockdown* wurde auf einem Immunoblot verifiziert. PR130 negative S821 Zellen zeigten zusätzlich eine schwächere Induktion von HSP70 nach einer PD-Behandlung (**Anhang 5A – C**).

Die Daten aus den MIA PaCA-2 und aus den murinen PDAC Zellen deuten auf eine anti-apoptotische Wirkung von PR130 in diesen Zellen hin. Darüber hinaus scheint ein *knockdown* von PR130 nicht zu einer Anhäufung von HSP70 zu führen.

Im nächsten Schritt wird untersucht, ob eine Abwesenheit von PR130 in Zellen die Bildung von zytotoxischen Aggregaten begünstigt. Um diese Hypothese nachzuweisen, wurden MIA PaCA-2 Zellen erneut mit einer siRNA gegen PPP2R3A transfiziert und anschließend mit PD behandelt. Eine durchflusszytometrische Analyse der Aggresombildung zeigte, dass PR130-*knockdown* Zellen bei einer PD-Behandlung tatsächlich mehr Aggregate bildeten als PR130-profizienten (**Abb. 58A**). Eine Quantifizierung der Daten aus **Abb. 58A** zeigte, dass der beobachtete Unterschied statistisch relevant war. Eine PD-Behandlung zeigte in der murinen epithelialen Zelllinie S821, weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von PR130, eine Aggregatbildung (**Abb. 58B, C**).

5. Ergebnisse

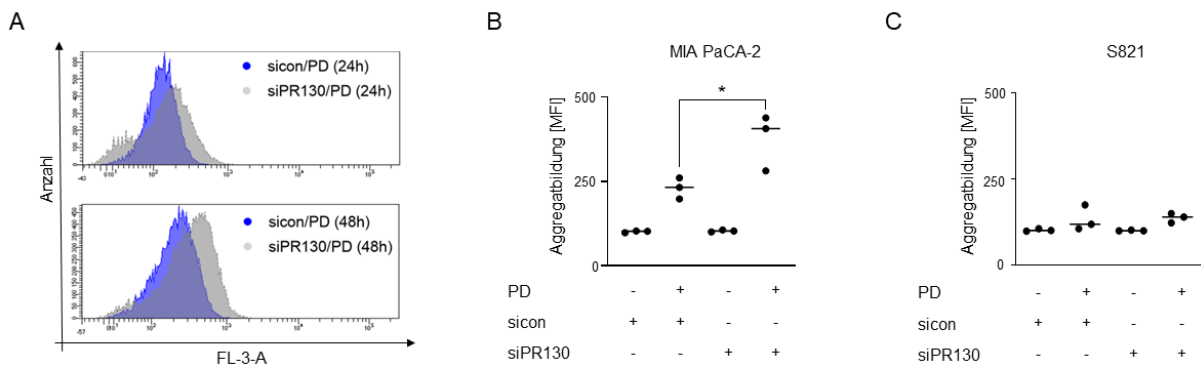


Abbildung 58: Ein Knockdown von PR130 erhöht die Bildung von zytotoxischen Proteinaggregaten nach einer Behandlung mit PD. (A) siRNA-Transfektionen wurden wie in (57A) beschrieben durchgeführt; sicon: Kontroll-siRNA; siPR130: siRNAs gegen PR130. Nach der Transfektion wurden MIA-PaCA-2-Zellen mit 3 μ M PD behandelt und nach 24 h und 48 h geerntet. Die Daten wurden mit dem Aggresom-Detektionskit analysiert und mittels Durchflusszytometrie gemessen; $n = 3$. (B) Quantifizierung der Daten aus (A). Die Daten wurden mittels Varianzanalyse (one-way ANOVA) statistisch ausgewertet (* $p < 0,05$). (C) Die murine epitheliale PDAC Zelllinie S821 wurde wie in (XA) beschrieben mit siRNA gegen PR130 transfiziert. Die Aggregatbildung wurde mit dem Aggresom-Detektionskit mittels FACS Analyse ausgewertet. Eine durchgeführte Varianzanalyse (one-way ANOVA) ergab keine statistischen Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Bedingungen.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass eine PP2A-Inhibierung, basierend auf der Reduktion von PR130, die Zellen in die Apoptose treibt, was wiederum eine Bildung der zytotoxischen Aggregate zur Folge hat.

5.9. Die Kombination aus PD und einem WEE1-Inhibitor erwies sich als ein guter therapeutischer Angriffspunkt in PDAC und Leukämiezellen

5.9.1. Zellzyklusanalyse und Zelltodbestimmung in mit PD und MK-1775 behandelten MIA PaCA-2 Zellen

In einer Studie aus dem Jahre 2011 konnte bereits gezeigt werden, dass der selektive WEE1 Inhibitor MK-1775, sowohl in der Einzelbehandlung als auch in Kombination mit Gemcitabin, gute Erfolge zur Bekämpfung von PDAC zeigte [272]. Die Proteinkinase WEE1 übernimmt eine zentrale Rolle in der Regulierung des Zellzyklus, in dem sie den Übergang von der G2-Phase in die Mitose reguliert [449]. WEE1 wird hierbei über eine negative Rückkopplung von CDK1 reguliert. Somit hat sich die WEE1-Kinase als ein vielversprechendes therapeutisches Ziel in der Krebsforschung etabliert [266].

Wie aus den Zellzyklusanalysen der MIA PaCA-2 Zellen mit PD hervor ging, zeigten diese Zellen nach 48 h eine Akkumulation in der G2/M-Phase (s. **Abb. 41B**). Um diesen Effekt zu verstärken, wurde der PP2A-Inhibitor PD mit dem WEE1-Kinase-Inhibitor MK-1775 kombiniert.

Dabei wurden MIA PaCA-2 Zellen mit 1 μM PD und 500 nM MK-1775 für 24 h und 48 h behandelt. Eine Zellzyklusanalyse zeigte, dass PD sowohl nach 24 h als auch nach 48 h eine Reduktion der G1-Phase verursachte. Nach 48 h kam es zusätzlich zu einer Akkumulation von Zellen in der G2/M-Phase bei 1 μM PD. Die beschriebenen Beobachtungen erreichten in beiden Fällen eine statistische Relevanz. Nach 24 h zeigte MK-1775 in der Einzelbehandlung eine Reduktion der G1-Phase, nach 48 h arretierten die Zellen zusätzlich in der S- und der G2/M-Phase. Auch hier waren die Beobachtungen signifikant.

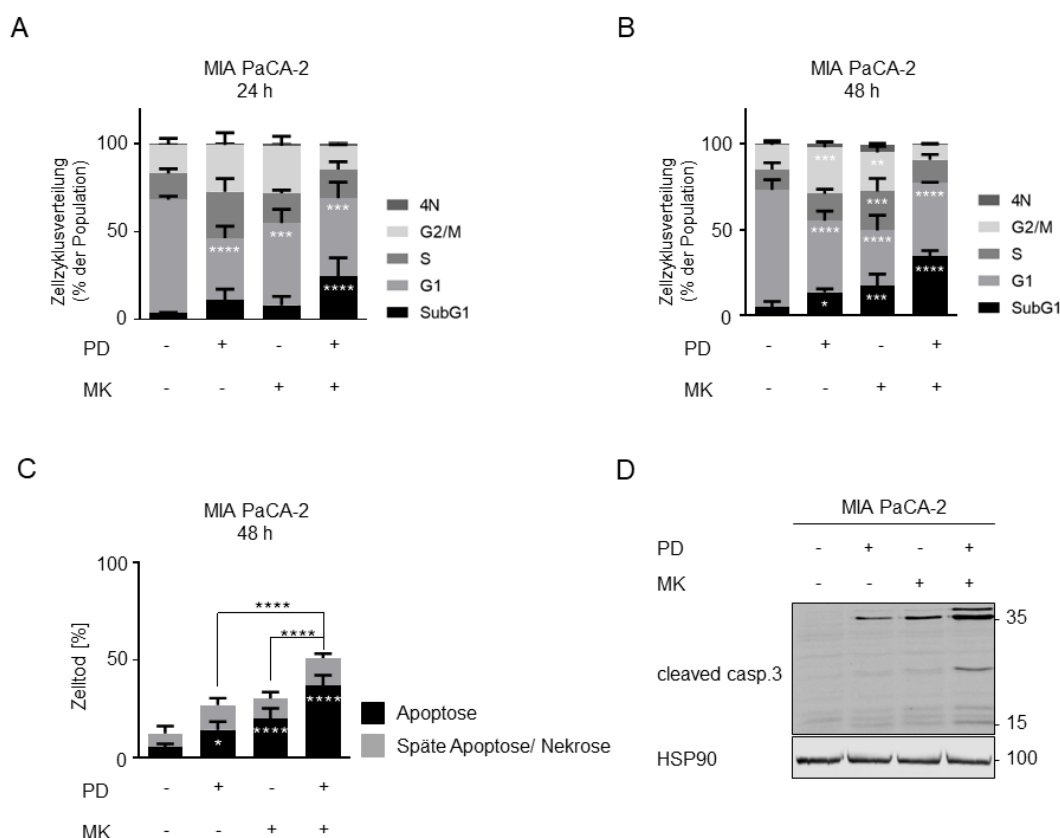


Abbildung 59: Die Kombination PD + MK-1775 führt zur Apoptose assoziierten DNA-Fragmentierung in MIA PaCA-2 Zellen. (A) MIA PaCA-2 Zellen wurden mit 1 μM PD und 500 nM MK-1775 für 24 h behandelt. Eine Detektion von PI positiven Zellen am Durchflusszytometer wurde durchgeführt; $n = 3$. (B) Der Versuchsansatz von (A) wurde für 48 h wiederholt. PI positive Zellen wurden durchflusszytometrisch detektiert; $n = 3$. (C) MIA PaCA-2 Zellen wurden für 48 h mit 1 μM PD und 500 nM MK-1775 behandelt. Die Detektion von Annexin-V/PI positiven Zellen am Durchflusszytometer erfolgte unmittelbar nach der Ernte; $n = 3$. Die Signifikanzen zwischen den Balken beziehen sich auf die Frühapoptose. Alle Daten aus (A), (B), und (C) sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). (D) MIA PaCA-2 Zellen wurden mit 3 μM PD und 500 nM MK-1775 behandelt und für weitere 24 h kultiviert. Ein Immunoblot wurde durchgeführt, um die Isoformen des Apoptosemarkers Caspase-3 zu detektieren; $n = 3$.

In der Kombinationstherapie PD + MK-1775 blieb die G1-Phase nach 24 h und nach 48 h immer noch signifikant reduziert. Nach 24 h wurde die SubG1-Fraktion weder von PD noch von MK-1775 in der Einzelbehandlung induziert.

Eine Kombination aus beiden Inhibitoren führte jedoch nach 24 h zu einer statistisch relevanten Zunahme der SubG1-Fraktion. Nach 48 h konnte eine signifikante Zunahme der SubG1-Fraktion, sowohl in den Einzelbehandlungen als auch in der Kombinationsbehandlung wahrgenommen werden (**Abb. 59A, B**).

Diese Zellzyklusanalyse wurde auch in MIA PaCA-2 Zellen mit 2 μM PD durchgeführt (**Anhang 6B**). Die dabei gefundenen Effekte waren ähnlich zu den Effekten aus **Abb. 59**. Es ist erwähnenswert, dass die SubG1-Fraktion mit 2 μM PD für den 48 h in der PD-Einzelbehandlung und in Kombination mit MK-1775 eine stärkere Induktion zeigte (**Anhang 6B**).

Ergänzend zu der Zellzyklus Analyse wurde auch die Apoptose, über die Detektion von Annexin-V positiven Zellen, bestimmt. Dafür wurden MIA PaCA-2 Zellen erneut mit 1 μM PD und 500 nM MK-1775 für 48 h behandelt. Sowohl PD als auch MK-1775 induzierten signifikant die Apoptose in den behandelten Zellen. Die Effekte aus den Einzelbehandlungen konnten durch eine Kombination beider Inhibitoren verstärkt werden. Alle genannten Effekten erlangten nach 48 h eine statistische Relevanz (**Abb. 59C**). Eine Zelltod Analyse wurde ebenfalls mit einer höheren Dosis von 3 μM PD nach 24 h durchgeführt. Dabei konnten keine nennenswerten Effekte gezeigt werden (**Anhang 6A**). Die PD-bedingten Effekte aus **Abb. 59C** konnten außerdem durch eine Erhöhung der Dosis auf 2 μM (statt 1 μM PD) verstärkt werden. Nach 72 h zeigte die Behandlung mit 500 nM MK-1775 keine signifikante Induktion der Apoptose. Eine Kombination aus PD + MK-1775 steigerte außerdem nicht mehr die Effekte von PD in der Einzelbehandlung (**Anhang 6C, D**).

In einer Western Blot Analyse konnte, zusätzlich zu der durchflusszytometrischen Analyse der Apoptose, der Apoptosemarker Caspase-3 detektiert werden. PD und MK-1775 zeigten in der Einzelbehandlung eine Induktion der Caspase-3, in der Kombination wurden zusätzlich noch die Isoformen dieses Proteins detektiert (**Abb. 59D**).

5.9.2. Die Inhibitoren PD und MK-1775 lösen in MIA PaCA-2 Zellen eine mitotische Katastrophe aus

Anschließend wurden die Proteine der DNA-Schadensantwort und der Checkpoint-Signalwege bei einer PD und MK-1775 Behandlung analysiert. Dafür wurden MIA PaCA-2 Zellen mit 3 μ M PD und 500 nM MK-1775 für 24 h behandelt.

Ein Immunoblot zeigte eine Induktion von p-KAP1 in der PD Einzelbehandlung und in Kombination mit MK-1775. Die Behandlung mit MK-1775 führte ebenfalls zu einer Induktion von p-KAP1 im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Effekt war jedoch schwächer als der von PD. PR130 und CHK1 zeigten wie erwartet eine Reduktion bei der Behandlung mit PD (**Abb. 60A**).

Die Abnahme von CHK1 und PR130 in PD-behandelten Zellen wurden nicht durch die Kombination PD + MK-1775 abgeschwächt. Darüber hinaus kam es bei jeder Bedingung zu einer Induktion von p-CHK1 (S345) und γ -H2AX, wobei letztere in der Kombinationsbehandlung am stärksten war (**Abb. 60A**). Dieses Ergebnis verifizierte die Beobachtungen aus der SubG1-Bestimmung (s. **Abb. 59A**).

Im nächsten Schritt wurde zunächst überprüft, ob MK-1775 zuverlässig die WEE1-Aktivität in MIA PaCA-2 Zellen inhibiert. Dafür wurden die Zellzyklusregulatoren p-CDK1, WEE1 und Cyclin B detektiert. Ist WEE1 aktiv, so liegt CDK1 phosphoryliert und somit inaktiv vor. Die Detektion von p-CDK1 zeigte, dass in der Kontrolle und in der PD Einzelbehandlung dies der Fall war. Hier erfolgte noch ein kontrollierter Eintritt in die Mitose. Durch die Zugabe von MK-1775 war kein p-CDK1, sowohl in der Einzelbehandlung als auch in Kombination mit PD, mehr detektierbar. Passend dazu zeigten WEE1 und Cyclin B eine Abnahme in der MK-1775 Einzelbehandlung und in der Kombination MK-1775 + PD. Dieses Resultat spricht für eine erfolgreiche Inhibierung von WEE1 in der Kombination PD + MK-1775 und steht ebenfalls im Einklang mit den Ergebnissen aus **Abb. 59A, B**, da der Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase unter diesen Bedingungen erfolgreich umgangen werden konnte. Die Detektion von PLK1 zeigte eine kontinuierliche Abnahme in PD und MK-1775 behandelten Proben (Einzel- und Kombinationsbehandlung). Eine Reduktion von PLK1 könnte auf eine Zunahme der p-PLK1 Form andeuten, welches mit den Effekten von MK-1775 einhergeht (**Abb. 60B**).

5. Ergebnisse

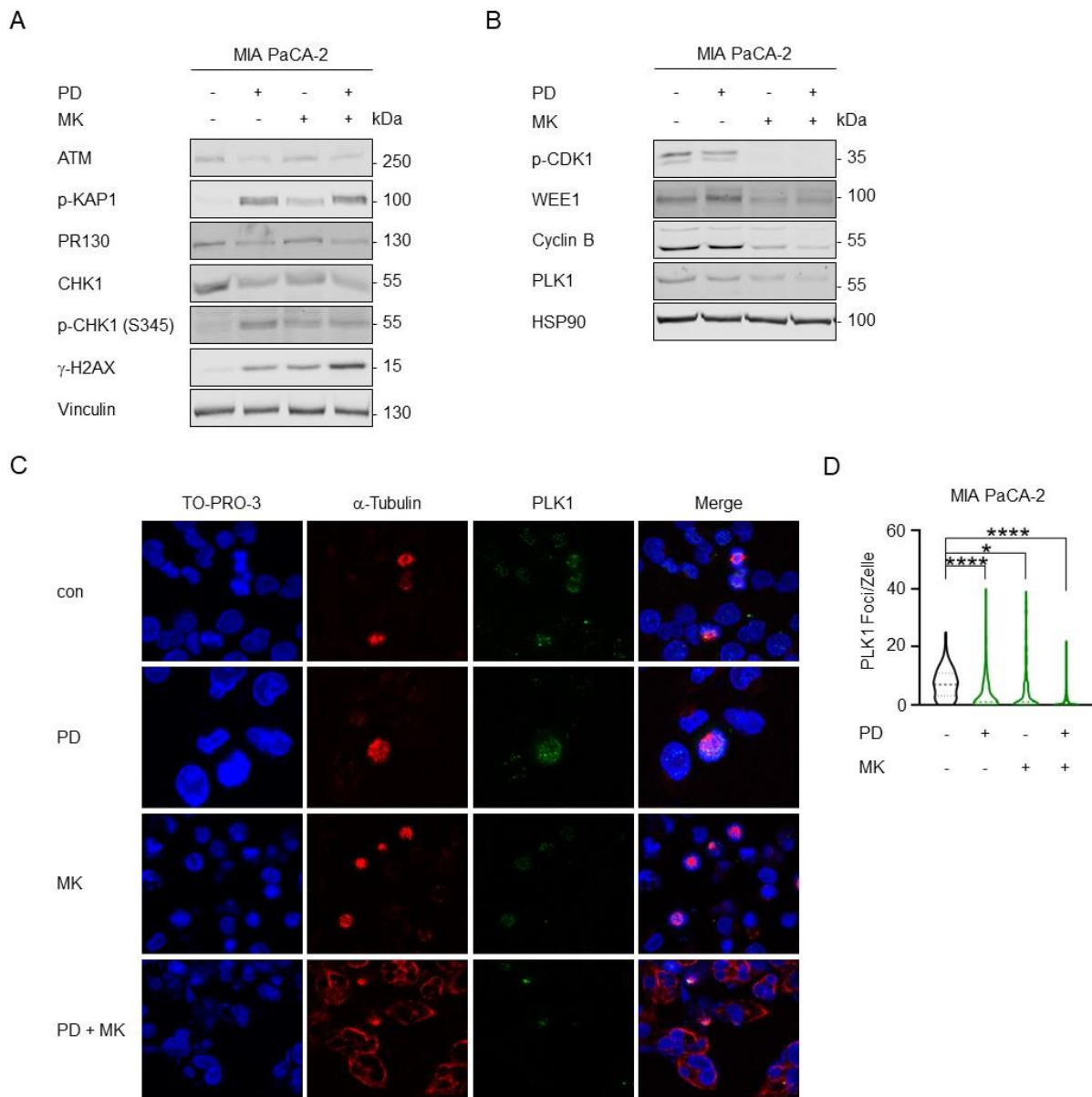


Abbildung 60: Die Kombination aus PD und MK-1775 führt zur mitotischen Katastrophe in MIA PaCA-2 Zellen. (A) MIA PaCA-2 Zellen wurden mit 3 μ M PD und 500 nM MK-1775 behandelt und für 24 h inkubiert. Immunoblots wurden durchgeführt, um die Proteine der DNA-Schadensantwort zu detektieren. Vinculin wurde zur Kontrolle der gleichmäßigen Ladung detektiert; $n = 2$. (B) MIA PaCA-2 Zellen wurden wie in (A) beschrieben behandelt und analysiert. Es wurden p-CDK1, WEE1, CyclinB und PLK1 detektiert. HSP90 diente als Ladekontrolle; $n = 2$. (C) MIA-PACA-2-Zellen waren entweder unbehandelt (con) oder wurden 24 h mit 3 μ M PD und 500 nM MK-1775 behandelt, fixiert und mit anti- α -Tubulin- oder anti-PLK1-Antikörpern inkubiert. Zur Detektion wurden an Alexa Fluor-488 (grün, PLK1) und Cy3 (rot, α -Tubulin) gekoppelte Antikörper verwendet. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde TO-PRO3 verwendet. Gezeigt werden repräsentative Bilder; $n = 3$. Die Analyse der PLK1 Foci pro Zelle wurde mit der Software ImageJ durchgeführt. Die Maßstabsleiste beträgt 10 μ m. (D) Quantifizierung von PLK1 Foci in PD und MK-1775 behandelten MIA-PACA-2-Zellen. Die Daten wurden durch Zählen von 100 Zellen in jedem von den drei unabhängigen Durchläufen erhoben. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD angegeben, statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (one-way ANOVA) wurden durchgeführt (**** $p < 0,0001$).

Um die Beobachtungen im Immunoblot zu verifizieren und die Effekte von MK-1775 zu verdeutlichen, wurden α -Tubulin und PLK1 mikroskopisch detektiert. Das Protein α -Tubulin ist ebenfalls wichtig in der Mitose, da dieses bei der Ausbildung von Mikrotubulis beteiligt ist [253].

Die mikroskopische Detektion von α -Tubulin zeigte im Vergleich zu den Kontrollzellen, dass in PD und MK-1775 behandelten Zellen der Spindelapparat eine gekrümmte und abnormale Form angenommen hat. Dieses Phänomen trat dabei in MK-1775 behandelten Zellen häufiger auf als in PD-behandelten Zellen. Außerdem war auffällig, dass α -Tubulin in der Kombination PD + MK-1775 sich um den Zellkern legte. Unter Beachtung der Intensität konnte gleichzeitig eine Zunahme von α -Tubulin in PD + MK-1775 behandelten Zellen beobachtet werden. Zu dem zeigte die Auszählung und Quantifizierung der PLK1 Focis eine signifikante Abnahme von PLK1 unter allen Versuchsbedingungen (**Abb. 60C, D**).

5.9.3. Die zytotoxischen Effekte von PD und MK-1775 sind auf murine PDAC Zelllinien übertragbar

Die Effekte von MK-1775 wurden ebenfalls in murinen PDAC Zellsystemen untersucht. Da der epitheliale PDAC Subtyp eine geringe Sensitivität gegenüber PD zeigt und somit ein therapeutisches Problem darstellen kann (s. **Kap. 5.4.2.**), wurde untersucht, ob der epitheliale PDAC Subtyp sensitiv gegenüber einer Kombination von PD und MK-1775 ist.

Für die Analysen wurden S821 Zellen mit 5 μ M PD und 500 nM MK-1775 behandelt. Eine Zelltodbestimmung wurde nach 24 h, 48 h und 72 h durchgeführt. Nach 24 h wurden weder in der Einzel- noch in der Kombinationsbehandlung nennenswerten Effekte beobachtet. Nach 48 h hatte PD in der Einzelbehandlung keine Wirkung. Im Gegensatz dazu induzierte MK-1775 signifikant zu 21.9 % Apoptose in S821 Zellen. Nach 72 h betrug die Gesamtapoptose mit 5 μ M PD 19.4 %, während die Apoptoserate in mit MK-1775 behandelten Zellen mit 21.1 % vergleichbar zu der Apoptoserate nach 48 h war. Die Kombination von PD + MK-1775 führte nach 48 h zu einer Zunahme der Apoptoserate auf 30.2 %, während nach 72 h diese auf 53.8 % stieg. Nach 72 h war der Unterschied zwischen den Einzelbehandlungen und der Kombination hoch signifikant in der frühen Apoptose (**Abb. 61A-C**).

Da nach 24 h keine Effekte in der Zelltodbestimmung nachzuweisen war, wurde eine Zellzyklusanalyse nach 48 h und 72 h durchgeführt. Analog zu MIA PaCA-2 Zellen (s. **Abb. 59**) war die G1-Phase, sowohl in den Einzelbehandlungen (PD/MK-1775) als auch in der Kombination PD + MK-1775, signifikant reduziert. MK-1775 führte in der Einzelbehandlung zusätzlich zu einem G2/M-Arrest in S821 Zellen.

5. Ergebnisse

Die SubG1-Fraktion nahm, im Gegensatz zu den Einzelbehandlungen, nach 48 h in der Kombinationsbehandlung signifikant zu (**Abb. 61D**). Nach 72 h blieb die Reduktion der G1-Phase bei jeder Behandlung erhalten. Die Einzelbehandlungen bewirkten nach 72 h keine Induktion der SubG1-Fraktion, während die Kombination PD + MK-1775 diese signifikant induzierte (**Abb. 61E**).

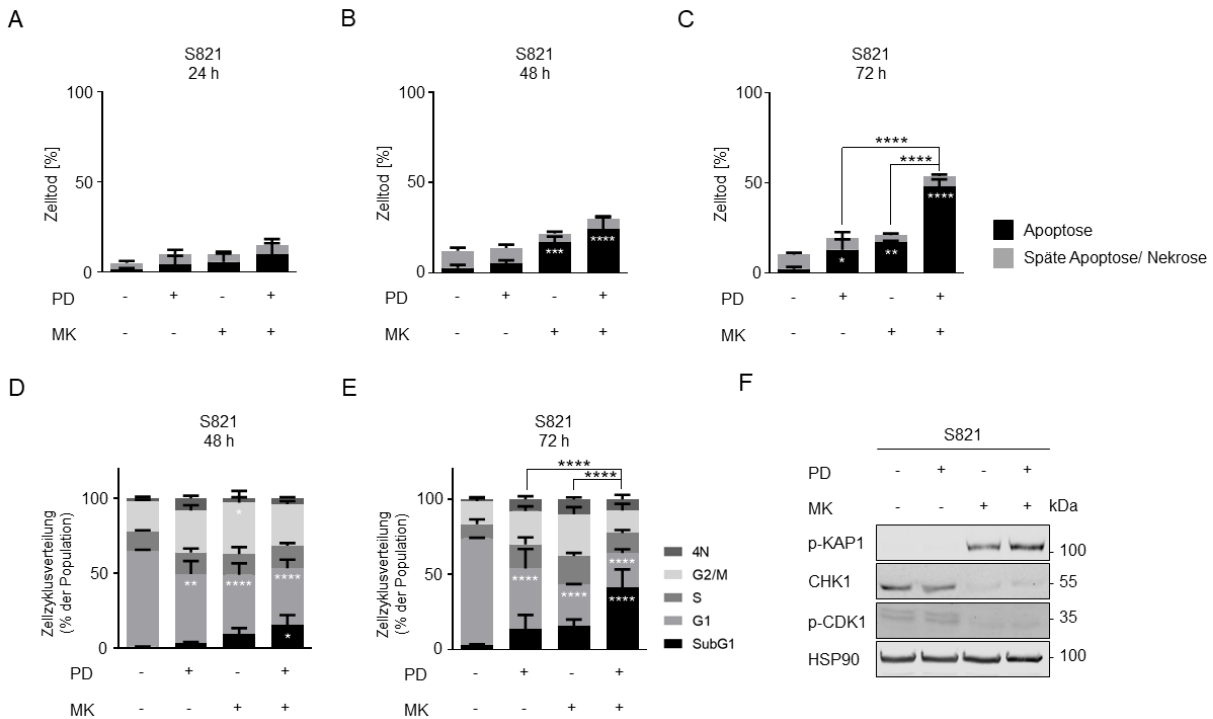


Abbildung 61: Zytotoxische Effekte einer PD + MK-1775 Kombinationsbehandlung treten bei der epithelialen murinen PDAC Zelllinie nach 72 h ein. (A) Die PD resistente Zelllinie S821 wurde mit 5 μ M PD und 500 nM MK-1775 behandelt. Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und mit Annexin-V und PI gefärbt. Der Zelltod wurde durchflusszytometrisch erfasst; $n = 3$. **(B)** Die Zelllinie S821 wurde wie in (A) beschrieben für 48 h behandelt und analysiert. Der Zelltod wurde ebenfalls mittels FACS Analyse bestimmt; $n = 3$. **(C)** Der Versuchsansatz aus (A) wurde für den Zeitwert 72 h wiederholt. Der Zelltod wurde mittels FACS Analyse, durch Detektion von Annexin/PI positiven Zellen, bestimmt; $n = 3$. **(D)** Die Zelllinie S821 wurde mit 5 μ M PD und 500 nM MK-1775 behandelt und für weitere 48 h kultiviert. Eine Detektion von PI positiven Zellen am Durchflusszytometer wurde durchgeführt; $n = 3$. **(E)** Die Zellen wurden wie in (D) beschrieben für 72 h behandelt und analysiert; $n = 3$. Alle Daten (A) - (E) sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). **(F)** S821 Zellen wurden mit der angegebenen Dosis an PD und MK-1775 für 24 h behandelt. Ein Immunoblot wurde durchgeführt, um p-KAP1, CHK1 und p-CDK1 zu detektieren. HSP90 diente zur Kontrolle einer gleichmäßigen Ladung; $n = 2$.

Die Detektion von p-CDK1 auf einem Immunoblot zeigte, dass MK-1775 auch in den murinen S821 Zellen potent und selektiv war. Es wurde eine Abnahme von p-CDK1 und CHK1 in MK-1775 behandelten Zellen (Einzel- und Kombinationsbehandlung) beobachtet. Außerdem konnte eine Zunahme von p-KAP1 in der MK-1775 Einzelbehandlung und in der Kombination PD + MK-1775 nachgewiesen werden. Die PD-Einzelbehandlung zeigte, wie erwartet, keine Zunahme des p-KAP1 Spiegels (**Abb. 61F**).

5.9.4. Die Kombination von PD und MK-1775 ist für leukämische Zellen toxisch. Es konnte nachgewiesen werden, dass WEE1 in Mammakarzinomen, Leukämiezellen, Melanomen und Glioblastomen hoch exprimiert werden [450]. In LeukämiepatientInnen ist der Expressionsspiegel von WEE1 mit einer schlechten Prognose assoziiert.

A

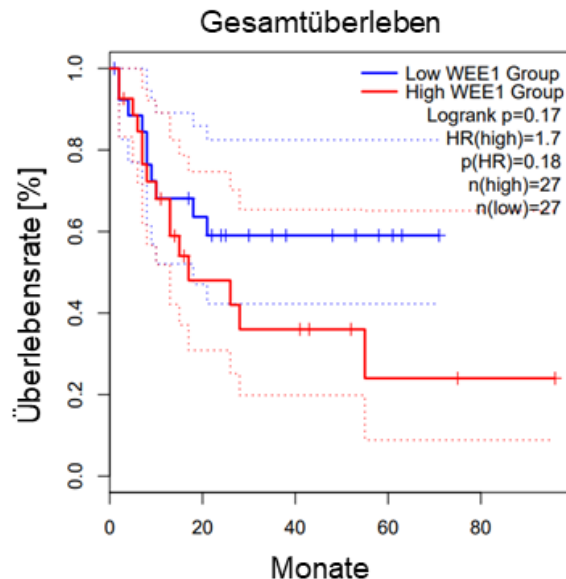


Abbildung 62: **Datenbankanalysen zeigen einen Zusammenhang zwischen der WEE1-Expression und dem Fortschreiten der Erkrankung bei AML.** (A) Die GEPIA2-Datenbank zeigt eine Korrelation zwischen der WEE1-Expression und dem Gesamtüberleben bzw. dem krankheitsfreien Überleben der PatientInnen (Cutoff 25 % niedrig und 75 % hoch; GEPIA2 enthält die Informationen der TCGA- und GTEx-Datenbank). Dargestellt sind die Gesamtüberlebensraten von AML-PatientInnen in Abhängigkeit von der CHK1-Expression in GEPIA 2 (cancer-pku.cn).

Diese Daten weisen auf WEE1 als tumorrelevante Zielstruktur hin. Um dies zu testen, wurden Leukämiezellen mit MK-1775 in Kombination mit PD behandelt. Für diese Analysen wurden MV4-11 und RS4-11 Zellen mit 500 nM PD und 500 nM MK-1775 behandelt. Es wurde eine Dosis von 500 nM PD ausgewählt, da 1 μ M PD eine zu hohe Apoptoserate in MV4-11 Zellen nach 24 h verursachte (s. **Abb. 44A**). Geringere Dosen als 500 nM PD oder 500 nM MK-1775 bewirkten nach 24 h keine relevanten Effekte in den getesteten Zelllinien (**Anhang 7**). Die Hemmung von p-CDK1 belegt eine erfolgreiche Inhibierung von WEE1 in den Leukämiezellen (**Anhang 8**). Die Einzelbehandlung der MV4-11 Zellen mit PD führte in der durchflusszytometrischen Zelltodbestimmung und der Zellzyklusanalyse nach 24 h zu keinen nennenswerten Effekten.

5. Ergebnisse

Im Gegensatz dazu führte nach 24 h eine Behandlung mit MK-1775 zu einer signifikanten Induktion der frühen und späten Apoptose/Nekrose (47.1 % Gesamtapoptose), welche ebenfalls mit einer signifikanten Induktion der SubG1-Fraktion (35.0 %) und einer Abnahme der G1-Phase einhergingen. Die Kombination PD + MK-1775 löste ebenfalls eine Zunahme der Apoptoserate auf 75.8 % aus, wobei die Gesamtapoptose signifikant höher war als die jeweiligen Einzelbehandlungen. In der Zellzyklusanalyse konnten diese Beobachtungen nur bedingt widerspiegelt werden da nur der Vergleich zwischen der PD Einzelbehandlung und der Kombinationsbehandlung signifikante Unterschiede hervorbrachte (**Abb. 63A, B**).

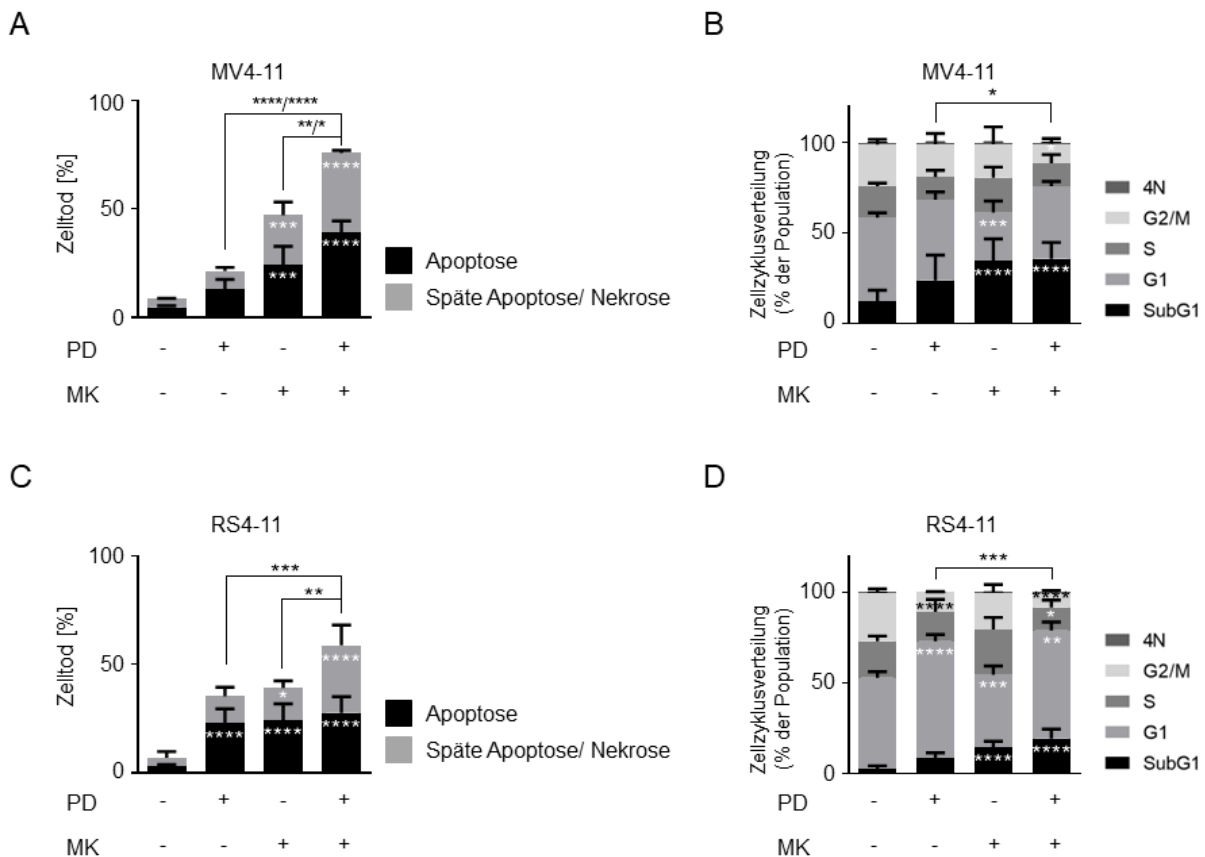


Abbildung 63: Die Kombination aus PD und MK-1775 führt nach 24 h zur Apoptose-assoziierte DNA-Fragmentierung in leukämische Zellen. (A) Eine Zelltodbestimmung und (B) eine Zellzyklusanalyse wurden in MV4-11 Zellen durchgeführt. Dazu wurden diese Zellen für 24 h mit 500 nM PD und 500 nM MK-1775 behandelt. Die Daten entstammen aus durchflusszytometrischen Analysen; jeweils $n = 3$. (C) Eine Messung der Apoptose und (D) eine Zellzyklusanalyse wurden in RS4-11 Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen für 24 h mit 500 nM PD und 500 nM MK-1775 behandelt. Die Daten entstammen aus durchflusszytometrischen Analysen; jeweils $n = 3$. Alle Daten (A) - (D) sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Die Signifikanz zwischen den Balken in (A) steht für Frühapoptose/Spätapoptose und in (C) für die Frühapoptose. Die Signifikanzen zwischen den Balken in (B) und (D) beziehen sich auf die SubG1-Fraktion.

Auch für RS4-11 Zellen wurde eine Zellzyklusanalyse und eine Zelltodbestimmung nach der Behandlung mit PD und MK-1775 durchgeführt, wobei PD bzw. MK-1775 in beiden Einzelbehandlungen signifikant die Apoptose induzierte (Gesamtapoptose für PD: 35.1 %, für MK-1775: 39.2 %).

Die Apoptoserate konnte durch eine Kombination dieser beiden Inhibitoren zusätzlich auf 58.7 % gesteigert werden, wobei der signifikante Unterschied in der frühen Apoptose lag. Die Zellzyklusanalyse zeigte überraschenderweise eine hoch signifikante Zunahme der G1-Phase bei der Behandlung mit PD (**Abb. 63C, D**). Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu den Ergebnissen aus den murinen und humanen PDAC Zelllinien, da in diesen Zellen immer eine Reduktion der G1-Phase beobachtet wurde (s. **Abb. 59, Abb. 61**). In RS4-11 Zellen führten die MK-1775 Einzelbehandlung und die Kombination PD + MK-1775 zu einer signifikanten Akkumulation der Zellen in der SubG1-Phase, welche mit einer Abnahme der G1-Phase einherging. Der Vergleich zwischen der PD-Einzelbehandlung und der Kombination PD + MK-1775 zeigte einen signifikanten Unterschied in RS4-11 Zellen (**Abb. 63C, D**).

5. Ergebnisse

5.9.5. Die Kombination von PD und MK-1775 lösen keine zytotoxischen Effekte in PBMCs aus

Auch in den PBMCs wurden die Effekte von MK-1775 in der Einzelbehandlung und in Kombination mit PD getestet. Auch hier wurde aufgrund einer Primärkultur nur der 24 h Wert analysiert. Alle Zellen wurden mit 1 μ M PD und 500 nM MK-1775 behandelt. Die Ernte und die Färbung erfolgten analog, wie in **Kapitel 4.2.4.**, beschrieben. Eine durchflusszytometrische Bestimmung des Zelltods zeigte, dass weder MK-1775 noch die Kombination MK-1775 + PD zu einer Induktion der Apoptose in PBMCs führten (**Abb. 64**).

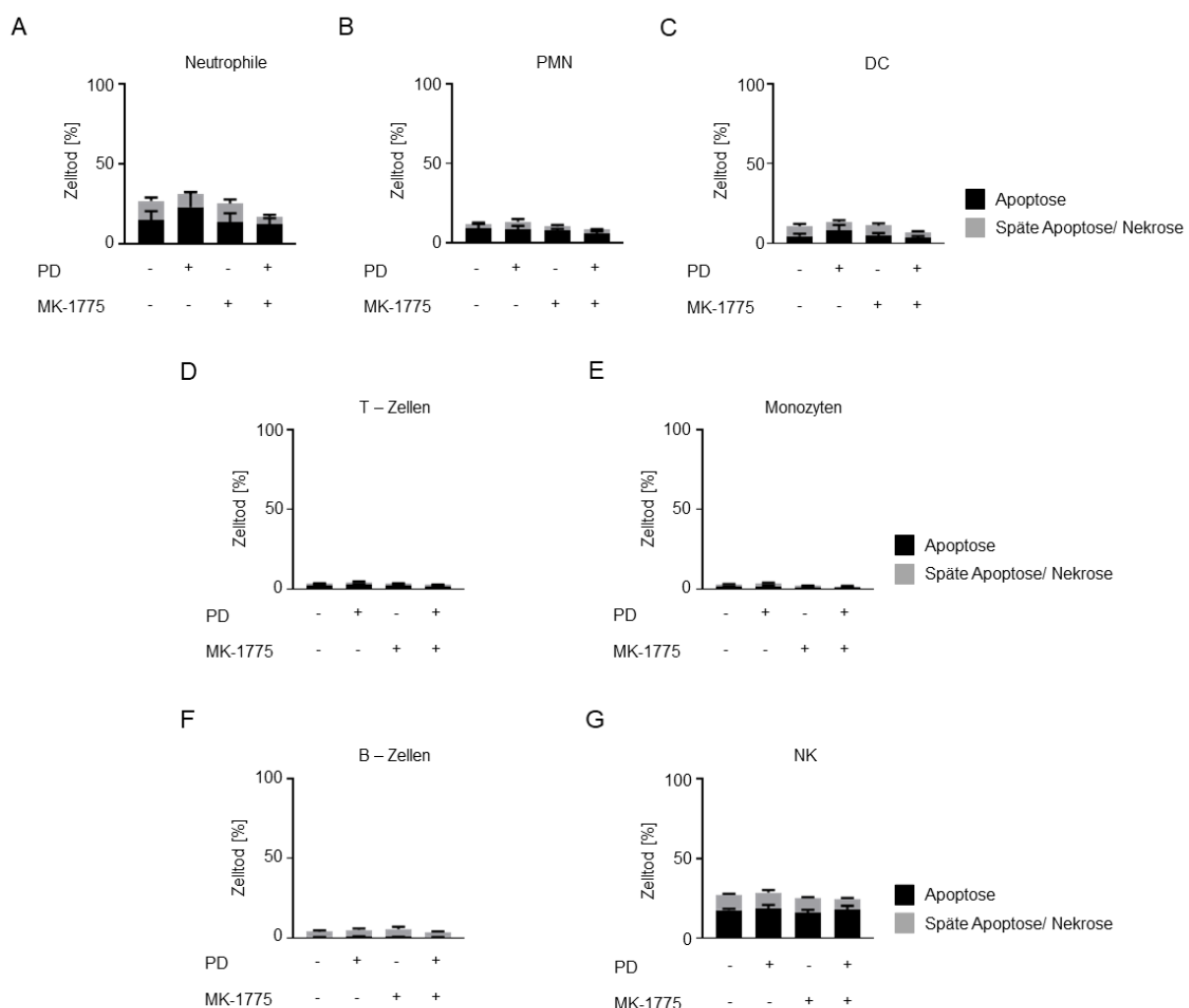


Abbildung 64: Sowohl der PP2A-Inhibitor als auch der WEE1-Kinase-Inhibitor zeigten keine zytotoxischen Effekte in den Immunzellen nach 24 h. Die (A) Neutrophile, (B) PMN, (C) DC, (D) T-Zellen, (E) Monozyten, (F) B-Zellen und (G) die NK Zellen wurden 24 h mit 1 μ M PD + 500 nM MK-1775 behandelt. Die Messung der Apoptose wurde durchflusszytometrisch durchgeführt; jeweils $n = 4$. Alle Daten (A) - (G) sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) ergaben keine statistische Relevanz. Diese Daten wurden ausschließlich von Frau Yanira Zeyn im Rahmen einer Kooperation mit der AG Grabbe/Bros von der Universitätsmedizin in Mainz durchgeführt. Für eine erhöhte Aussagekraft dieses Projekts, wurden diese in die Dissertation inkludiert.

6. Diskussion

6.1. Molekulare Effekte von HU, MS-275, IT und COH29 im murinen PDAC Zellsystem

6.1.1. Hemmung von Klasse I HDACs führt in murinen PDAC Zellen nicht zum Zelltod

Die Behandlungen mit den RNR-, HDAC- und TOP-1-Inhibitoren lösten unterschiedliche Reaktionen in murinen PDAC Zelllinien aus. Die Behandlung der Zellen mit den RNR-Inhibitoren HU und COH29 führten zu einer Aktivierung der DDR, die zu einer apoptotisch bedingten DNA-Fragmentierung führte (**Kapitel 5.1., 5.3.**). Im Gegensatz dazu, zeigte der HDACi MS-275 und der TOP-1-Inhibitor IT auch nach 48 h keine DNA-Fragmentierung oder eine Induktion der Apoptose (**Kapitel 5.1., 5.2.**). Darüber hinaus zeigt diese Arbeit, dass ATM eine pro-apoptotische Rolle in murinen PDAC Zellen hat. Eine Inhibierung dieses Proteins schwächt HU-abhängige DNA-schädigende Effekte ab und reduziert die durch HU induzierte Apoptose (s. **Abb. 23, 24**).

Die beobachtete Wirkung von MS-275 in PDAC Zellen ist verwunderlich, da der HDACi in Kolorektalkarzinomen [86, 451], Osteosarkomen, Rhabdomyosarkomen [133] und Melanomzellen [134] zu einem G1-Arrest führt, wodurch das Zellwachstum gehemmt und Apoptose induziert wird.

Eine Zellzyklusanalyse der vier murinen PDAC Zelllinien zeigte mit 1 μ M und 5 μ M MS-275 weder nach 24 h noch nach 48 h einen G1-Arrest. Im Gegensatz dazu wurde sogar eine Verringerung der G1-Phase nach beiden Zeitwerten beobachtet (s. **Abb. 18, 19**). Nach 48 h konnte zudem eine signifikante Zunahme der polyploiden Fraktion in 8248 und S821 Zellen beobachtet werden, welche auf eine mögliche Seneszenz deutet (s. **Abb. 19**). Seneszenten Zellen können sich nicht mehr teilen, wodurch sie nicht mehr auf Chemotherapeutika ansprechen und zu einer Therapieresistenz beitragen [452, 453]. Ein Merkmal der Seneszenz ist die Zunahme der polyploiden Zellfraktionen [452]. Ob die getesteten PDAC Zellen tatsächlich durch eine MS-275 Behandlung in die Seneszenz eintreten, bedarf weiterer Analysen. So müssten zusätzlich eine X-Gal Färbung [454] oder eine C_{12} -FDG [455] Messung nach längeren Zeitwerten (z.B. 96 h, 120 h oder 144 h) durchgeführt werden, um diese Vermutung zu bestätigen.

Obwohl MS-275 in vielen Krebszellen Apoptose induziert [112, 113, 133-136], konnte dieser HDACi im murinen PDAC Zellsystem nicht die erwarteten Ergebnisse erzielen (s. **Abb. 18, 19**). Die Wirkung von MS-275 in PDAC Zellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits wurden in den PDAC Zelllinien BxPC-3 und PANC-1 nachweislich das Zellwachstum mit 1 μ M MS-275 reduziert. Dieser Effekt war jedoch erst nach 96 h signifikant [456, 457]. Andererseits wurde in einer Studie publiziert, dass nach 72 h in MS-275-behandelten (1 μ M) BxPC-3 Zellen weder Annexin-V positive Zellen noch die apoptotischen Isoformen der Caspase-3 (nach 48 h) detektiert werden konnten [458]. Die Zellzyklus-abhängigen Effekte von MS-275 konnten jedoch immer nachgewiesen werden [456, 457].

6.1.2. Die inhibitorische Wirkung auf die RNR von COH29 ist stärker als von HU

Die Behandlung mit HU führte erst nach 48 h zu einer signifikanten Induktion der SubG1-Fraktion in den getesteten Zelllinien (s. **Abb. 19**). Eine Inhibierung des RNRs in PDAC Zellen scheint in dieser Hinsicht wirksamer zu sein als eine Hemmung der HDAC-Aktivität. Jedoch zeigte keines der Zelllinien einen Arrest in der S-Phase (s. **Abb. 19**), was verwunderlich war, da ein Angriff auf die RNR die DNA-Synthese in dieser Phase beeinträchtigen sollte [195]. Im Vergleich dazu zeigte COH29 bereits nach 24 h einen signifikanten Anstieg der SubG1-Fraktion, welche mit einer signifikanten Reduktion der G1-Phase und einen Arrest in der S-Phase einhergingen (s. **Abb. 27**). Nach 48 h konnten diese Effekte jedoch nicht gesteigert werden, was wiederum gegen diesen Inhibitor spricht, da die Effekte weder zeit- noch dosisabhängig verstärkt werden können.

Eine Reduktion der G2/M-Phase konnte nach 48 h in HU-behandelten, jedoch nicht in COH29-behandelten Zellen beobachtet werden (s. **Abb. 19, 27**). Trotz der Tatsache, dass sowohl HU als auch COH29 RNR-Inhibitoren sind, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die beobachtete DNA-Fragmentierung auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen ist. HU-behandelte Zellen scheinen alle Zellzyklus-Kontrollpunkte zu überwinden, wodurch die beschädigten Zellen in die Mitose getrieben werden, was zum Untergang der Zellen führt. Diese Beobachtungen deuten auf eine mitotische Katastrophe hin und wurde ebenfalls in HCT116 Zellen in der Kombination zwischen HU + MS-275 beobachtet [86].

Im Gegensatz dazu, führte die COH29 Behandlung wie erwartet einen Arrest in der S-Phase, wodurch RS angetrieben wird. Das Endergebnis blieb jedoch gleich, da beider RNR-Inhibitoren tödlich für die behandelten PDAC Zellen waren (s. **Kap. 5.1., 5.3.**). Interessanterweise scheint eine unvollständige Inhibierung der Zellzyklusprogression durch HU wirksamer zu sein als eine stärkere Inhibierung des RNRs durch COH29, da ein erfolgreicher S-Phasen Block geringere Zelltodraten hervorbrachte. Die DNA-Fragmentierung und die Aktivierung der DDR durch HU und COH29 konnten durch eine Induktion von γ -H2AX, und zusätzlich durch eine Aktivierung von p53 sowie p21 in einer Western Blot Analyse verifiziert werden (s. **Abb. 21, 27**).

6.1.3. Die Behandlung mit HU, MS-275 und COH29 führen in PDAC Zellen zu einem Verlust von CHK1

Im Vergleich dazu führten MS-275 behandelte Zellen zu keiner Induktion von γ -H2AX oder p53 (s. **Abb. 21**). Es konnte allerdings Gemeinsamkeiten zwischen den unterschiedlichen Zytostatika gefunden werden. Alle vier Zelllinien zeigten bei Zugabe von COH29, MS-275 oder HU eine Akkumulation von p21 und eine Reduktion der Checkpoint-Kinase CHK1 (s. **Abb. 21, 27**). Die Reduktion von CHK1 kann durch eine p53-abhängige Unterdrückung der CHK1-mRNA-Expression [459] erklärt werden und deutet auf eine Zunahme von p-CHK1 hin. Es ist bekannt, dass eine Phosphorylierung von CHK1 durch ATR ausgelöst wird, welches selbst durch Replikationsstress aktiviert wird [86, 460]. Die vermeintliche Phosphorylierung von CHK1 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, da eine Detektion von p-CHK1 an Ser317, Ser345 oder Ser296 in murinen PDAC Zellen mit den kommerziell erhältlichen Antikörpern nicht möglich war.

Allerdings könnte die Reduktion des CHK1-Spiegels in HU-behandelten Zellen erklären, weshalb die Zellen mit HU nicht wie erwartet in der S-Phase arretierten. Es wurde gezeigt, dass CHK1 das Fortschreiten der Zellen im Zellzyklus bei RS stoppt [461]. Da der CHK1-Spiegel in den PDAC Zelllinien jedoch durch eine Behandlung mit HU deutlich reduziert wird, kann ein Zellzyklusarrest nicht mehr gewährleistet werden und die Zellen durchlaufen weiter den Zellzyklus. Somit kommt es zu den bereits beschriebenen tödlichen Effekten.

Dieses Phänomen konnte bereits in Zellen beobachtet, in denen die Funktion von ATR und CHK1 eingeschränkt waren. In diesem Fall kam es zu einer übermäßig starken Aktivierung von ATM, die in einer Apoptose endeten [86, 462, 463]. Dieses Ergebnis ist somit direkt vergleichbar mit den HU-behandelten PDAC Zellen.

6.1.4. ATM ist essenziell für eine erfolgreiche Induktion der Apoptose im murinen PDAC Zellsystem

Die Kombination aus HU + MS-275 zeigte nur in S411 synergistische Effekte in der Zelltodanalyse nach 48 h (s. **Abb. 20**). In der Zellzyklusanalyse schwächte die Zugabe von 1 μ M MS-275 die HU-bedingten zytotoxischen Effekte zusätzlich ab (s. **Abb. 19**). Diese Effekte spiegeln sich ebenfalls in der Expression von p-KAP1 wider (s. **Abb. 22**), welches das direkte Zielgen von ATM ist [441]. Statt p-ATM wurde p-KAP1 detektiert, da die Detektion von phosphoryliertem ATM in murinen Zellen nicht möglich war.

Sowohl ATM als auch ATR werden nehmen der Literatur eine zytoprotektive Rolle an. Die ATR-CHK1 Signalkaskade wird bei einer Behandlung mit HU in Melanom-, Kolorektal-, Lungen-, und Schilddrüsenkarzinomzellen aktiviert, welche essenziell für das Überleben dieser Zellen ist [86, 460, 462, 464-466]. Die Aktivierung von ATM wird in der Literatur mit einem anti-apoptotischen Signal assoziiert, da dieses Protein die Überlebenswege PI3K/AKT [467] und MAPK/ERK [468] reguliert.

Im getesteten PDAC Zellsystem übernimmt ATM jedoch nicht wie erwartet die zytoprotektive Rolle an, sondern scheint eher aktiv an der Induktion der HU-bedingten Apoptose teilzunehmen. Die Expression von ATM und seine phosphorylierte Form p-ATM Ser1981 werden durch PP2A/PR130 kontrolliert, während HDAC1 und HDAC2 die Expression von PR130 negativ regulieren [86]. Demnach fördert MS-275 die PR130 Expression durch eine Inhibierung von HDAC1-HDAC3. In der Western Blot Analyse zeigten zwar einige PDAC Zelllinien lediglich eine schwache Induktion von PR130 mit der MS-275 Behandlung, dennoch konnte auch bei diesen Zellen, die HU-induzierte Expression von p-KAP1 durch Zugabe von Entinostat reduziert werden (s. **Abb. 22**). Dies lässt vermuten, dass möglicherweise eine Acetylierung von PR130 die Gesamtheit an ATM und p-ATM in diesen PDAC Zellen bestimmt.

In HCT116 Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass Entinostat nicht nur die Expression von PR130 beeinflusst, sondern auch dessen Acetylierungsstatus [86]. In dem getesteten PDAC Zellsystem wurde eine Acetylierung von PR130 jedoch nicht untersucht, wodurch hier keine klare Aussage getroffen werden kann.

Die pro-apoptotische Rolle von ATM in den murinen PDAC Zellen wurde überprüft, indem HU behandelte Zellen mit dem ATM Inhibitor KU-60019 behandelt wurden. Es ist bekannt, dass KU-60019 auch DNA-PKcs und ATR inhibieren kann. In Glioblastomzellen wurde die ATM spezifische Wirkung von KU-60019 nachgewiesen [442]. In der Tat zeigten sowohl Zellzyklusanalysen als auch eine Bestimmung der Apoptoserate, dass KU-60019 die Effekte von HU abschwächte (s. **Abb. 23**). In einer Western Blot Analyse wurde die Phosphorylierung von H2AX mit KU-60019 in HU-behandelten Zellen abgeschwächt. Auch die Isoformen des Apoptosemarkers Caspase-3 waren in der Kombination HU + KU-60019 reduziert (s. **Abb. 24**).

All diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass die getesteten murinen PDAC Zelllinien sich den zytotoxischen Effekten von HU, in Abwesenheit von ATM, entziehen können. Physiologisch aktives ATM ist somit essenziell für eine effektive Induktion der Apoptose in HU-behandelten Zellen. Somit korreliert eine Inhibierung dieses Proteins direkt mit schlechteren Überlebenschancen der PDAC PatientInnen [469].

6.1.5. Die Behandlung mit HU führt zu einer Akkumulation von RRM2 in PDAC Zellen

Die Expression von RRM2 wurde durch HU nicht verringert, obwohl HU dieses Protein direkt inhibiert. In den PDAC Zellen wurde ein gleichbleibender oder ansteigender Spiegel an RRM2 beobachtet (s. **Abb. 21**). Diese Beobachtungen lassen sich erklären, denn im Gegensatz zu RRM1 variiert der Spiegel an RRM2 abhängig von der Zellzyklusphase. RRM1 hingegen wird konstitutiv exprimiert, während RRM2 in der G1-Phase langsam akkumuliert, in der S-Phase maximal exprimiert und zum Eintritt in die Mitose wieder abgebaut wird [470, 471]. Folglich sollte ein HU-bedingter DNA-Schaden zu einer Akkumulation von RRM2 in den behandelten Zellen führen.

Die beobachtete Akkumulation von RRM2 wurde durch 5 μ M MS-275 in der Einzelbehandlung reduziert. Nur in S411 Zellen wurde eine Reduktion von RRM2 im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls mit 1 μ M MS-275 beobachtet (s. **Abb. 21**).

Es könnte sein, dass durch die Inhibierung von HDAC1-3 eine Methylierung des Histons H3 induziert wird, welches akkumuliert und die Transkription von RRM2 unterdrückt. Dieses Ereignis wurde bereits an Mocetinostat (HDAC1-Inhibitor) [472] und Sorafenib [473] gezeigt. Sorafenib ist in erster Linie kein HDACi, seine inhibierende Wirkung auf die HDACs wurde jedoch bestätigt [474].

6.1.6. RAD51 wird durch MS-275 reguliert

Das HR-Protein RAD51 wurde mit 5 μ M MS-275 in der Einzel- und in der Doppelbehandlung mit HU reduziert (s. **Abb. 21**). Diese Beobachtungen entsprechen den Erwartungen, da eine Verbindung zwischen einem HDACi und RAD51 bereits nachgewiesen wurde [475, 476]. In AML-Zellen wurde diese Beziehung bereits ausgenutzt, um die Zellen gegenüber Sapaticabin zu sensitivieren [476]. Die Abnahme von RAD51 in HU-behandelten Zellen passt ebenfalls zu der Akkumulation von p-KAP1 und γ -H2AX, da beide Proteine stressinduzierte DNA-Strangbrüche markieren (s. **Abb. 21, 22**). Das γ -H2AX zeigte in der HU + MS-275 Kombination keinen Unterschied im Vergleich zur HU-Einzelbehandlung (s. **Abb. 21**). Passend aus den Ergebnissen der Zellzyklusanalysen, zeigte die HU/MS-275-Kombination keine synergistischen Effekte im PDAC Zellsystem. Das war verwunderlich, da MS-275 die HU-bedingten Effekte in HCT116 Zellen verstärkte [86]. Des Weiteren wurde in der Kombination HU + KU-60019 eine Reduktion von γ -H2AX in allen vier PDAC Zelllinien nachgewiesen (s. **Abb. 24**). Dieser Vergleich deutet erneut daraufhin, dass die Abnahme von RAD51 in dem murinen PDAC Zellsystem nicht auf eine Inaktivierung von ATM selbst, sondern auf die Inhibierung der HDACs zurückzuführen ist.

6.1.7. Die Rolle von IT in PDAC

Die Behandlung mit IT zeigte keine nennenswerten Effekte in den murinen PDAC Zellen, da sowohl eine Zelltodanalyse als auch eine Zellzyklusanalyse keine Zunahme der Apoptoserate zeigte (s. **Abb. 25, 26**). Auffällig war, dass die Behandlung mit IT in der Zellzyklusanalyse überraschenderweise, keinen S-Phasen Arrest [206] zeigte (s. **Abb. 25**). Auch in der Western Blot Analyse wurde keine Aktivierung von p-KAP1, p53, γ -H2AX oder Caspase-3 durch IT detektiert.

Eine Aktivierung der Checkpoint-Signalkaskade, über eine Abnahme der CHK1-Expression, konnte in IT-behandelten Zellen ebenfalls nicht gezeigt werden. Im Gegensatz zu HU, scheint IT somit keine Auswirkungen auf die murinen PDAC Zelllinien zu haben (s. **Abb. 26**). Theoretisch sollte die Wirkung von IT sich in der S-Phase entfalten. Bei der Replikation bildet IT mit der TOP-I und der DNA einen ternären Komplex, wodurch die Topoisomerase nicht mehr freigesetzt und die DNA nicht mehr ligiert werden kann. Es kommt zu einer Kollision des Komplexes mit den fortschreitenden Replikationsgabeln, was zu DSBs führt. Diese aktivieren die DNA-Schadensantwort, welche in der Regel in einer Apoptose enden [477].

Da IT-behandelte PDAC Zellen weder eine Apoptose noch einen Zellzyklus-Arrest herbeiführten, liegt die Vermutung nahe, dass IT nicht effizient in der Einzelbehandlung gegen PDAC Zellen sind. In der Tat werden PDAC PatientInnen mit IT behandelt, jedoch nur in Kombination mit Fol, 5-FU und Ox (FOLFIRINOX). Dieses Behandlungsschema zeigt zwar eine höhere Effektivität als die Behandlung mit Gemcitabin, geht jedoch ebenfalls mit einer erhöhten Toxizität einher.

COH29, HU, MS-275 und IT zeigten unterschiedliche pharmakologische Effekte in den murinen PDAC Zellen. Während die Effekte von MS-275 und IT in den getesteten Zelllinien wünschenswert blieben, zeigte der RNR-Inhibitor HU nicht die aus der Literatur bekannten Effekte. Auch COH29 konnte seine Wirkung nicht vollends entfalten. Somit wurde erneut gezeigt, dass eine Behandlung von PDAC mit den Standardtherapien weiterhin schwierig bleibt. Es ist daher von besonderem Interesse weitere Signalwege dieser Krebszellen aufzudecken, damit effiziente Angriffspunkte und neue Behandlungsstrategien gefunden werden können.

6.2. Die Hemmung von PP2A hat unterschiedliche Auswirkungen in murine und humane PDAC Zelllinien, sowie in Leukämie und in normal proliferierenden Zellen

6.2.1. Die Phänotypen der murinen PDAC Zelllinien und ihre unterschiedlichen Reaktionen auf PD

Proteinphosphorylierungen sind neben Methylierungen und Acetylierungen der einfachste Weg, um Proteinfunktionen zu modifizieren, wobei dieser Vorgang reversibel ist. Eine wichtige Phosphatase ist das Protein PP2A, welches ungefähr 1 % der zellulären Protein Gesamtmenge ausmacht. PP2A ist eine Ser/Thr-Phosphatase, die durch ihre regulatorische Untereinheit PP2A-B gesteuert wird [83]. Das in dieser Arbeit untersuchte PR130 ist eines dieser regulatorischen Untereinheit. Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigten, dass die murinen PDAC Zelllinien in einen mesenchymalen und einen epithelialen Phänotyp klassifiziert werden können. Der mesenchymale Subtyp zeigt eine konstitutiv hohe Expression an PPP2R3A/PR130, wobei andere B-Untereinheiten weniger bis gar nicht davon betroffen sind (s. **Abb. 28**). Der hohe PR130 Spiegel im mesenchymalen Subtyp spiegelt das Krankheitsbild in PatientInnen mit PDAC wider, da eine hohe PR130 Expression mit schlechten Überlebenschancen korreliert [101]. Die Expression von PP2A-A und PP2A-C sind in den unterschiedlichen Phänotypen vergleichbar. Durch den Epithelzellmarker E-Cadherin konnte der Ursprung der Zellen verifiziert werden [46]. Zellen, in denen E-Cadherin nachweisbar war, gehören dem epithelialen Subtyp an (s. **Abb. 29**). Demnach gehören alle Zelllinien, die kein E-Cadherin exprimieren zum mesenchymalen Subtyp. Es wurde mehrmals vergeblich versucht, die mesenchymale Markerproteine Vimentin, N-Cadherin oder β -Catenin in den murinen PDAC Zellen zu detektieren.

Werden die unterschiedlichen Zelllinien mit PD behandelt, so zeigt der mesenchymale Subtyp eine bemerkenswerte Anfälligkeit gegenüber diesem PP2Ai, während der epitheliale Subtyp auch nach 48 h ein resistentes Verhalten in Anwesenheit von PD zeigt (s. **Abb. 30 – 32**). Demnach scheinen Zellen, die viel PR130 exprimieren, besonders auf dieses Protein angewiesen zu sein. Die hohen Zelltoderaten spiegeln sich überraschenderweise nicht in der Zellzyklusanalyse wider. Während eine PD-Behandlung nach 24 h bereits bis zu 100 % Annexin-V/PI positive Zellen zählte, stieg die SubG1-Fraktion auch nach 48 h nicht über 30 % (s. **Abb. 31, 34A, B**).

Dieses Ergebnis impliziert, dass PD Apoptose induziert, ohne dabei die DNA zu fragmentieren. Eine Western Blot Analyse zeigte, dass in diesen Zellen sowohl p53 als auch p-KAP1 durch PD schon nach sehr frühen Zeitwerten aktiviert werden (s. **Abb. 36**). Dieses Phänomen wurde bereits in BRAF mutierten Melanomzellen beobachtet und wird von Autoren dieser Publikation als „gezielte Chemotherapie“ bezeichnet. Hier führt eine Inhibierung von PP2A zu einer Aktivierung der DNA-Schadensantwort, welche Apoptose induziert, jedoch ohne dabei die DNA physisch zu „brechen“ [216]. Durch die Aktivierung von p53 und p-KAP1 konnte die Aktivierung der DNA-Schadensantwort auch in murinen PDAC Zelllinien bestätigt werden. Das Ausbleiben der DNA-Fragmentierung wurde in dieser Dissertation über die niedrige SubG1-Fraktion verifiziert. Allerdings hätte ein Komet-Assay als eine weitere Nachweismethode dienen können, da diese Methodik Einzel- und Doppelstrangbrüche nachweist und diese Hypothese zusätzlich stützen könnte.

Die pharmakologischen Auswirkungen von PD beschränkten sich jedoch nicht nur auf den mesenchymalen Subtyp, denn auch Zellen des epithelialen Subtyps zeigten eine Induktion von p-KAP1 und p53. Die Proteine der Überlebenssignalwege p-ERK und p-AKT wurden ebenfalls in beiden Subtypen gleichermaßen induziert (s. **Abb. 36**). Diese Ergebnisse lassen durchblicken, dass PD zu einer Hyperaktivierung der PI3K/AKT und MAPK Signalwege führt, wodurch die Zellen, ungeachtet von ihrem Zustand, zur Zellteilung angetrieben und so in eine Apoptose gebracht werden. Diese neuartige Therapiemethode ist vor allem gegen arzneimittelresistente Krebszellen gerichtet, da ein Austritt aus dem Zellzyklus verhindert wird und ein Entkommen vor der Apoptose ausgeschlossen werden soll [216].

In Bauchspeicheldrüsenkrebszellen oder auch in anderen Krebsarten ist der wichtige Tumorsuppressor p53 mutiert oder geht nach Fortschreiten der Krebserkrankung verloren [478]. Dieser Fakt konnte auch in den murinen PDAC Zelllinien nachgewiesen werden, denn p53 und sein direktes Zielprotein p21 zeigten in diesem Zellsystem kein klares Expressionsmuster. Bei einer PP2A-Inhibierung wurde p53 in beiden Subtypen gleichermaßen aktiviert. Diese Fakten deuten darauf hin, dass die apoptotischen Effekte von PD vermutlich p53-unabhängig ablaufen. Diese Hypothese konnte durch die Analyse der p53-negativen Zelllinie W22 bestätigt werden. In Anwesenheit von PD wurden KAP1 und H2AX phosphoryliert, welche mit einer stetigen Zunahme der Apoptose einhergingen (s. **Abb. 37**).

Somit kann PD auch in p53-Null Zellen, oder in Zellen mit mutiertem p53, seine volle Wirkung entfalten. Der PD-bedingte Verlust der Zellviabilität ging in W22 Zellen mit einer Abnahme von PR130 einher. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nah, dass ein hoher PR130 Spiegel für das Überleben dieser Zellen essenziell sein könnte. Diese Erkenntnis steht ebenfalls im Einklang mit den Resultaten aus dem mesenchymalen Subtyp der getesteten PDAC Zelllinien (s. **Abb. 29A-B, 31**).

6.2.2. Murine PDAC Subtypen und humane PDAC Zelllinien im Vergleich

Um zu überprüfen, ob die erläuterten PD Effekte auch auf humane PDAC Zellen übertragbar sind, wurden verschiedene PDAC Zelllinien mit diesem PP2Ai behandelt. In allen Zelllinien wurde durch diese chemische Verbindung reproduzierbar Apoptose induziert, welche ebenfalls mit einer Phosphorylierung von ATM, H2AX, KAP1 und CHK1 an Ser345 einherging (s. **Abb. 38, 39, 43**). Die Induktion von γ -H2AX im Immunoblot durch PD wurde durch die Detektion von γ -H2AX Focis verifiziert (s. **Abb. 41**). Auch die Expression von p-ERK und p-AKT wurde in den humanen Zelllinien induziert (s. **Abb. 43**). Allerdings konnte der epidermale und mesenchymale Phänotyp aus den murinen PDAC Zelllinien nicht auf humane Zelllinien übertragen werden. Die Ergebnisse aus **Kapitel 5.5.** zeigten, dass humane epitheliale PDAC Zelllinien gleichermaßen auf PD reagieren wie mesenchymale PDAC Zelllinien. Somit können die murinen PDAC Zelllinien nur als ein gutes Modell betrachtet werden, die durch ihre markanten Unterschiede in den unterschiedlichen Subtypen bei der Klassifizierung und der Einordnung der PD-Effekte hilfreich waren.

Wie erwartet, zeigten auch humane PDAC Zelllinien nur einen geringen Zusammenhang zwischen der Apoptose und der DNA-Fragmentierung (s. **Abb. 38, 39, 41, 42**). Die Induktion der DNA-Schadensantwort ohne DNA-Strangbrüche kann somit auch auf humane PDAC Zelllinien übertragen werden. Allerdings zeigen diese Zellen eine deutlich höhere SubG1-Fraktion als die murinen mesenchymalen PDAC Zellen.

6.2.3. PP2A-abhängige Effekte in MIA PaCA-2 und RPE-1 Zellen

Im direkten Vergleich zeigten MIA PaCA-2 und RPE-1 Zellen ein unterschiedliches Verhalten bezüglich einer PP2A-Inhibierung. Im Gegensatz zu der PDAC Zelllinie MIA PaCA-2 wurde in RPE-1 Zellen auch mit der höchsten Dosis an PD (5 μ M) nicht die Apoptose induziert, obwohl eine Phosphorylierung von ATM, KAP1, H2AX und RPA in diesen Zellen nachgewiesen werden konnte.

In den Kontrollproben war die Expression von RAD51 in MIA PaCA-2 Zellen vergleichbar mit der in RPE-1 Zellen (s. **Abb. 46**). Diese Erkenntnis war verwunderlich, da RAD51 in Krebszellen und vor allem in PDAC Zellen überexprimiert wird [479, 480]. Allerdings führte die PD-Behandlung der RPE-1 Zellen zu einer Abnahme von RAD51, wohingegen der Spiegel an RAD51 in MIA PaCA-2 Zellen konstant blieb. Die Abnahme von RAD51 könnte darauf hindeuten, dass PD eine HR in RPE-1 Zellen zunächst induzierte, welche aber zu dem Zeitpunkt der Analyse bereits abgeschlossen war. Eine post-translationale Ubiquitylierung von RAD51 an Lys58/64 führt zu einem Abbau dieses Proteins [481]. Ob PD zu einer Ubiquitylierung von RAD51 in RPE-1 Zellen führt, wodurch der Abbau dieses Proteins über das Proteasom induziert wird, bedarf weiterer Analysen. Diese Hypothese würde die geringen Zelltodrate und die Detektion von p-RPA im Immunoblot erklären. Eine Western Blot Analyse zu einem früheren Zeitpunkt hätte möglicherweise eine Induktion von RAD51 in RPE-1 Zellen gezeigt. Der Fakt, dass in MIA PaCA-2 Zellen keine Induktion von p-RPA nachgewiesen werden konnte, bestätigt erneut die postulierte Wirkung von PD, da dieser PP2Ai Apoptose induziert, ohne dabei Strangbrüche zu generieren [216]. Die gleichbleibende Expression von RAD51 in MIA PaCA-2 könnte daher darauf hindeuten, dass keine HR aktiviert wurde und deshalb dieses Protein gleichbleibend exprimiert wird.

6.2.4. Die PD-bedingte Apoptose in PDAC Zellen kann durch Z-VAD-FMK und Navitoclax moduliert werden

Die anti-apoptotischen Proteine BCL-X_L oder MCL-1 sind in PDAC Zellen höher exprimiert als in gesunden Zellen, wodurch Apoptose unterdrückt wird. Somit stellt ein gezielter Angriff auf diese Proteine einen möglichen therapeutischen Ansatz für die Bekämpfung von PDAC [482, 483]. Durch die Kombination PD + Z-VAD-FMK/Navitoclax konnte die Apoptoserate direkt beeinflusst werden.

Durch die Caspase-Inhibierung wurde die PD-bedingte Apoptoserate verringert, wohingegen eine Inhibierung der anti-apoptotischen Proteine zu einer Zunahme der Apoptoserate in MIA PaCA-2 Zellen führte (s. **Abb. 40**). Allerdings konnte Z-VAD-FMK die Apoptose in diesen Zellen nicht komplett unterdrücken. Auch Navitoclax konnte in Kombination mit PD keine 100 %-tige Apoptoserate in MIA PaCA-2 bewirken. Im Gegensatz dazu konnten epitheliale murine PDAC Zelllinien durch Navitoclax gegenüber PD sensitiviert werden. Eine Kombination dieser beiden Inhibitoren (PD + Navitoclax) maximierten die apoptotischen Effekte in S821 und 8296 Zellen. Der Unterschied zwischen den Einzelbehandlungen und der Kombinationsbehandlung war im epithelialen murinen Subtyp deutlicher als in MIA PaCA-2 Zellen (s. **Anhang 2**, s. **Abb. 40**).

Es wurde erwartet, dass die Kombination von PD mit Navitoclax die Apoptoserate in PDAC Zelllinien steigern würde, da dieser BCL-2 Inhibitor bereits erfolgreich gegen CLL [293], ALL [294], AML [295], aber auch gegen Melanome [296] und PDAC eingesetzt werden [297]. Es wurde z.B. ein CDK5-Inhibitor in MIA PaCA-2 Zellen eingesetzt, um MCL-1 zu inhibieren. In Kombination mit Navitoclax wurden in diesen Zellen die Apoptose maximiert [297]. Dadurch ist ersichtlich, dass die Wirkung von Navitoclax auch in Kombination mit anderen Wirkstoffen synergistische Effekte bewirken.

Durch die Zunahme von LC3B [309-311] und die Abnahme von p62 [312, 313] in PD-behandelten MIA PaCA-2 Zellen konnte eine Induktion der Autophagie durch PD gezeigt werden (s. **Anhang 3**). Der Prozess der Autophagie konnte die Zellen jedoch nicht vor einer Apoptose schützen.

6.2.5. Die Rolle von PP2A in Leukämiezellen

Die zytotoxischen Effekte einer PP2A-Inhibierung konnte ebenfalls in Leukämiezellen gezeigt werden, wobei die Zelllinien MV4-11, RS4-11 und RAMOS besonders empfindlich gegenüber PD reagierten (s. **Abb. 44**). Eine Langzeit-Analyse (72 h) zeigte zusätzlich, dass geringe Dosen an PD ausreichend waren, um in diesen Zellen hohe Apoptoseraten zu induzieren (s. **Abb. 45**). Diese Ergebnisse suggerieren, dass PP2A nicht nur in soliden Tumoren eine entscheidende Rolle übernimmt. Dass PD allgemein toxisch für jede Zellart sein könnte, wurde durch die Behandlung der RPE-1 und der PBMCs ausgeschlossen (s. **Abb. 46, 47**).

In Leukämiezellen wurde PP2A als therapeutischer Angriffspunkt bereits in der Literatur beschrieben [484]. Allerdings wurde in den getesteten Zellen Apoptose durch eine Aktivierung von PP2A ausgelöst. Die toxischen Effekte einer PP2A-Aktivierung wurde ebenfalls in Kolorektalkarzinomen beobachtet [485].

PD erzielte jedoch sowohl in murinen als auch in humanen PDAC Zelllinien eine Induktion der Apoptose durch eine Inhibierung von PP2A. Die Ergebnisse erscheinen somit zunächst widersprüchlich. Es wurde gezeigt, dass sowohl in Kolorektalkarzinomzellen als auch in AML-Zellen PP2A inaktiviert ist, da in diesen Zellen eine Überexprimierung der PP2A-Inhibitoren CIP2A oder SET vorliegt. In FLT3-ITD mutierten Zelllinien sind die strukturelle Untereinheit PP2A-A und einige spezifische regulatorische Untereinheit PP2A-B davon betroffen [486]. Durch eine Reaktivierung von PP2A werden Überlebenswege inhibiert und die Caspase-abhängige Apoptose gleichzeitig aktiviert [484, 485].

Die Rolle von PP2A ist somit von der Krebsart abhängig; die Wichtigkeit dieses Proteins ist damit ebenfalls unumstritten. Werden die Ergebnisse dieser Dissertation und die Forschungen aus der Literatur betrachtet, so bestimmt PP2A die Krebsaktivität und eine Dysregulation dieses Proteins ist häufig die Ursache für eine Krebsentstehung. Somit ist es nicht verwunderlich, dass sowohl eine Aktivierung als auch eine Inhibierung von PP2A in Krebszellen einen Zelltod induzieren kann [216, 484, 485].

6.3. Das Zusammenspiel von PR130, HSP70 und der Bildung von Proteinaggregate in PDAC Zellen

6.3.1. PR130 wird bei einer Behandlung mit PD über das Proteasom abgebaut

Weitere Analysen zeigten, dass die toxische Wirkung von PD in murinen mesenchymalen und in humanen PDAC Zellen auf eine Abnahme von PR130 zurückzuführen ist (s. **Abb. 48, 49**). In den epithelialen murinen PDAC Zelllinien konnte keine Abnahme von PR130 durch PD beobachtet werden.

Erneut wird ersichtlich, dass die klare Gliederung der murinen PDAC Zellen in ein epi/mes-System nicht auf humane Zelllinien übertragen werden kann, da auch in epithelialen humanen PDAC Zelllinien (BxPC-3 und DAN-G) eine PD-Behandlung zu einer Reduktion von PR130 führte (s. **Abb. 43, 49**). Die Untereinheiten PP2A-A oder PP2A-C wurden hierbei nicht von PD beeinflusst (s. **Abb. 48B**).

Dennoch blieb die Frage offen, wie PR130 abgebaut wird. Durch die Inhibierung der Proteasomaktivität und Autophagie wurden zwei mögliche Abbauewege von PR130 gehemmt. Im Gegensatz zum Lactacystin, konnte der Abbau von PR130 nicht durch Chloroquin gehemmt werden. Somit konnte bestätigt werden, dass der PD bedingte Abbau von PR130 über das Proteasom abläuft (s. **Abb. 50, 51**).

Dadurch, dass die Autophagie in erster Linie ein zytoprotektiver Mechanismus ist [302], wurde erwartet, dass eine Hemmung der Autophagie die Apoptoserate erhöht. In den PD-behandelten MIA PaCA-2 Zellen konnte keine signifikante Zunahme der Apoptose durch Chloroquin nachgewiesen werden. Jedoch konnte eine zunehmende Tendenz beobachtet werden, die möglicherweise durch eine höhere Dosis an Chloroquin signifikant werden würde. Jedoch war die verwendete Dosis an Chloroquin genug, um in S411 Zellen (murin, mes) die Apoptoserate von PD zu steigern (s. **Abb. 50**).

Auch die durchflusszytometrischen Effekte der PD-behandelten MIA PaCA-2 Zellen hätten durch eine höhere Dosis an Lactacystin verstärkt werden können, da der Abbau von PR130 in der Kombinationsbehandlung (PD + Lactacystin) im Immunoblot nachweislich gehemmt wurde (s. **Abb. 51**). Es bleibt jedoch unklar, ob PR130 auch auf mRNA-Ebene durch die Behandlung mit PD abgebaut wird. Eine quantitative PCR hätte hier klare Antworten geben können.

6.3.2. Die spezifische Induktion von HSP70 schützt PD-behandelte PDAC Zelllinien nicht vor dem Zelltod

Da das Proteasom sich als zentraler Bestandteil für den PD-bedingten Abbau von PR130 erwies, kam der Verdacht, dass HSPs ebenfalls ein zentraler Bestandteil des PD-getriggerten Mechanismus in PDAC Zellen sein könnten. Eine Proteomanalyse zeigte eine starke Induktion von HSPA1A in den murinen mesenchymalen Zelllinien, welche ebenfalls durch eine Induktion von HSP70 in Western Blot Analysen verifiziert werden konnten (s. **Abb. 52, 53**).

In der humanen PDAC Zelllinie MIA PaCA-2 wurde ebenfalls eine Induktion von HSP70 durch PD verzeichnet, welche jedoch nicht so stark ausfiel, wie die in den murinen mesenchymalen Subtypen (s. **Abb. 54A**). In BxPC-3 und PSN-1 blieb eine Induktion von HSP70 aus, jedoch zeigten diese Zelllinien im basalen Zustand bereits eine höhere HSP70-Expression als alle anderen humanen PDAC Zelllinien.

Demnach könnte es sein, dass in diesen Zellen keine Induktion von HSP70 notwendig ist, da dieses kontinuierlich exprimiert wird (s. **Anhang 4**). Eine Induktion von HSP70 in Zellen mit erhöhter PR130 Expression, korreliert somit direkt mit der Apoptose in diesen Zellen. Die PD-bedingte Induktion von HSP70 erfolgte hierbei bereits nach 6 h Inkubationszeit (s. **Abb. 53**) in S411 Zellen, während in derselben Zelllinie die Apoptose erst nach 8 h signifikant induziert wurde (s. **Abb. 33**). Diese Erkenntnis lässt vermuten, dass PD nach frühen Zeitwerten HSP70 induziert, wodurch der Abbau von PR130 über das Proteasom eingeleitet und schlussendlich die Apoptose in den betroffenen Zellen induziert wird.

Es war allerdings auffällig, dass PD zu einer spezifischen Induktion von HSP70 führte. Dass andere HSPs nicht davon betroffen waren, wurde durch Proteom- und Western Blot Analysen verifiziert (s. **Abb. 52, 54**). Dieses Ergebnis warf zunächst Fragen auf, da die Aktivität der HSPs voneinander abhängen können [328]. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass bei zellulärem Stress oder bei Einleitung der Apoptose HSP27 induziert wird [487]. Dies traf im PDAC Zellsystem nicht zu. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Okadasäure eine Hyperphosphorylierung von HSP90 einleitet, wodurch die Funktionen dieses Protein inaktiviert werden [488]. Daher lag die Vermutung nahe, dass ein HSP90-abhängiger Mechanismus die Bildung von Proteinaggregaten in den PD-behandelten PDAC Zellen, zusammen mit einer Aktivierung des Hitzeschockfaktors-1 (HSF-1), zu Grunde liegen könnte [489]. HSF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, welches selektiv Gene aktiviert, die für HSPs kodieren. Die Bildung der Proteinaggregaten könnte sich demnach über eine Hemmung von HSP90 erklären, was allerdings der Proteom- und Western Blot Analyse widersprechen würde. Daher fällt diese Spekulation in diesem Kontext weg. Eine Anhäufung von HSP70 bei Hemmung von PP2A müsste demnach mechanistisch sich von anderen proteotoxischen Stressoren (z. B. Proteasom Inhibitor, HSP90 Inhibitor) abgrenzen [421, 490].

Neueste Forschungsergebnisse mit dem PP2Ai LB100 könnten die selektive Induktion von HSP70 in den PDAC Zellen erklären. Hierbei konnte gezeigt werden, dass LB100 in Spleißvorgänge eingreift [491] und die Anhäufung von allen HSPs verhindert.

Das HSP70 ist nicht davon betroffen, da dieses Protein keine Introns besitzt und somit nicht der hitzeschockbedingten Translationshemmung unterlegen ist [492]. Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass mesenchymale PDAC Subpopulationen sehr empfindlich gegenüber Inhibitoren der Proteinfaltung sind [493]. Da PD wie LB100 ebenfalls ein PP2Ai ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die erläuterten Mechanismen ebenfalls in den PD-behandelten PDAC Zellen zutreffen.

6.3.3. Die Bildung der Proteinaggregate ist verantwortlich für die hohe Apoptoserate im PDAC Zellsystem

Die Hauptaufgabe von HSP70 ist die Faltung und der Zusammenbau von neu synthetisierten Proteinen oder der Rückfaltung von fehlgefalteten und aggregierten Proteinen. Die Induktion dieses Proteins ist ein zytoprotektiver Mechanismus [335, 336, 338-341] und eine erhöhte Expression von HSP70 deutet somit auf eine gestörte Proteostase hin [327]. Es stellt sich nun die Frage, weshalb Zellen mit hohen HSP70 Spiegeln in Apoptose geleitet werden (s. Abb. 31, 38, 53, 54).

Eine mögliche Erklärung ist, dass die Funktionen von HSP70 in diesen Zellen versagen, da dieses Protein überlastet oder fehlreguliert ist. Dadurch würden fehlgefaltete Proteine nicht mehr zurückgefaltet werden können und die Entstehung von Aggregaten könnte nicht mehr verhindert werden.

Wird diese Hypothese weiterverfolgt, so müsste das Proteasom eine erhöhte Aktivität zeigen, da diese Instanz nun dafür zuständig ist, die fehlgefaltete Proteine und die entstandenen Proteinaggregate abzubauen [327, 421]. Allerdings kann auch eine intakte Autophagie die Proteinaggregate über das Lysosom abbauen [423].

Vimentin ist ein Marker für fehlgefaltete Proteine und einer erhöhten Proteasom Aktivität [447, 448]. In PD-behandelten Zellen kam es zu einer erhöhten Expression von Vimentin, welche mit dem Auftreten von Isoformen einhergingen (s. **Abb. 43B, 56C**). Die Isoformen von Vimentin lassen sich erklären, da bereits gezeigt konnte, dass Vimentin während einer ablaufenden Apoptose ebenfalls ein Ziel der Caspase -3, -6 und -7 ist [494].

Obwohl das Proteasom durch eine PP2A-Inhibierung in MIA PaCA-2 Zellen eine höhere Aktivität zeigt, kann spekuliert werden, dass dieses System in dieser Situation überlastet ist. Es kommt zur Anhäufung von Proteinaggregaten, wodurch Apoptose in den mit PD behandelten Zellen induziert wird (s. **Abb. 38, 56**). In MIA PaCA-2 Zellen wurde die PD bedingte Aggregatbildung durchflusszytometrisch und mikroskopisch, durch die Detektion von Vimentin und Ubiquitin, nachgewiesen. Da Ubiquitin die fehlgefalteten Proteine für einen proteasomalen Abbau markiert, bestätigen die zunehmenden Ubiquitin Focis die Bildung der zytotoxischen Aggregate (s. **Abb. 56**). In der Literatur sind zytotoxische Proteinaggregate in neuronalen Zellen, aufgrund einer Hemmung von PP2A, verantwortlich für die Alzheimer Erkrankung [495]. Diese sind im PDAC Zellsystem jedoch zum Vorteil, da die Ausbildung von Proteinaggregaten die hochaggressiven Krebszellen in die Apoptose führen. Mögliche zukünftige klinische Studien mit PP2A-Inhibitoren sollten aufgrund dieses Zusammenhangs eine sorgfältige Überwachung der neuronalen Funktionen einführen. Laut den Ergebnissen aus **Kapitel 5.8.7.**, ist außer der Caspase-abhängigen Apoptose die Bildung von Proteinaggregaten ebenfalls verantwortlich für die hohen Zelltodraten in dem getesteten PDAC Zellsystem. Die Ergebnisse deuten an, dass PD eine Hyperphosphorylierung und damit die Fehlfaltung von Proteinen, die zur Aggregation neigen, leitet.

Zusammengefasst lösten die Behandlung von PD in den PDAC Zellen verschiedene Signale aus. Einerseits führte dies dazu, dass PR130 in Zellen mit einer erhöhten Expression durch das UPS abgebaut wird. Andererseits wurde HSP70 induziert, welches mit hohen Zelltodraten und einer Anhäufung von Proteinaggregaten korrelierte. In Zellen mit einer geringen PR130 Expression führte eine PD-Behandlung weder zu einem Abbau von PR130 noch zu einer Induktion von HSP70 und die damit einhergehende Apoptose (s. **Abb. 48, 53**). Auch die Anhäufung der Proteinaggregate blieben in diesen Zellen aus (**Anhang 5B**).

6.3.4. Die toxischen Effekte einer PP2A-Inhibierung in PDAC Zellen können mit einem HSP70i verstärkt werden

Nun stellt sich die Frage, ob PDAC Zellen gegenüber PD sensitiviert werden können, in dem zusätzlich die Induktion von HSP70 inhibiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass HSP70 in Krebszellen selektive Vorteile generieren, indem die extrinsische und intrinsische Apoptose sowie die Nekrose durch dieses Protein unterdrückt werden [338, 339]. Tatsächlich zeigten S411 und MIA PaCA-2 Zellen eine höhere Apoptoserate bei einer Kombination zwischen einem PP2Ai und einem HSP70i. Die PD-resistenten Zellen (8296) konnten dagegen nicht gegenüber PD sensitiviert werden, was zu erwarten war, da PD in diesen Zellen nicht zu einer Induktion von HSP70 führte (s. **Abb. 55**). Daher blieben die toxischen Effekte, sowohl bei einer Hemmung der Funktionen von PP2A als auch von HSP70 aus, da diese Zellen vermutlich für das Überleben nicht auf diese Proteine und ihre zugehörigen Mechanismen angewiesen sind. Die selektiven Effekte des HSP70i JG-98 wurden durch *Pulldowns*, Überexpression und Punktmutationsergebnisse bestätigt [338, 496, 497].

JG-98 zeigte in der Einzelbehandlung in allen getesteten PDAC Zellen keine zytotoxischen Effekte (s. **Abb. 55**). Im Gegensatz dazu, induzierte JG-98 in neonatale ventrikuläre Herzmuskelzellen der Ratte in der Einzelbehandlung bereits signifikant die Apoptose [498]. Dabei wurde nur eine Dosis von 10 nM JG-98 verwendet. Dass in den PDAC Zellen selbst bei 500 nM JG-98 nicht diese tödlichen Effekte erreicht werden konnte, zeigt erneut die hoch komplexe Regulation der HSP70 Abläufe in diesen Krebszellen. Vermutlich ist die Regulation in diesen Zellen so weit mutiert, dass geringe Konzentrationen an JG-98 nicht ausreichen, um in diesen Zellen die tödlichen Effekte auszulösen. Ob eine höhere Dosis an JG-98 ausgereicht hätte, um in den PDAC Zellen in der Einzelbehandlung schon die Apoptose zu induzieren, ist unklar. Das Einsetzen von höheren PD Konzentrationen in PDAC Zellen wäre in diesem Fall aufschlussreich gewesen. Durch die Ergebnisse aus **Abb. 55** konnte festgehalten werden, dass eine zusätzliche Hemmung von PP2A essenziell war, damit JG-98 in der Lage war die PDAC Zellen in eine Apoptose zu treiben. Darüber hinaus konnte ebenfalls in Medulloblastomzellen eine pharmakologische Hemmung von HSP70 das Wachstum dieser Zellen blockieren [499], wodurch sich die Frage erübrigt, wie viele weitere Tumorarten auf eine Kombinationstherapie mit einem PP2Ai und einem HSP70i ansprechen würden.

6.3.5. Ein genetischer *knockdown* von PR130 verstärkt die zytotoxischen Effekte von PD im PDAC Zellsystem

Im nächsten Schritt wurde die Expression von PR130 in MIA PaCA-2 und S411 Zellen durch eine RNAi vollends unterdrückt, wodurch die PD-Induktion der Apoptose in diesen Zellen noch mehr verstärkt wurde (s. **Abb. 57A, Anhang 5A**). Die erhöhten Apoptoseraten in MIA PaCA-2 Zellen gingen mit einer vermehrten Akkumulation von Proteinaggregaten einher (s. **Abb. 58A, B**). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PR130-PP2A Komplexe der zytotoxischen Proteinfehlfaltung und -aggregation entgegenwirken. Der Abbau von PR130 bis hin zum kompletten *knockdown* dieses Proteins steuert der Zellviabilität somit entgegen, wodurch ein Angriff auf PR130 die Vulnerabilität des aggressiven PDAC Subtyps unterstreicht. Obwohl epitheliale PDAC Zellen biochemisch auf PD reagierten, hatte PD dennoch keine tödlichen Auswirkungen auf diese Zellen (s. **Abb. 32, 36**). Auch ein genetischer *knockdown* von PR130 in murinen epithelialen Zelllinien konnte weder die Apoptoserate noch die Akkumulation der Proteinaggregate erhöhen (s. **Abb. 58C, Anhang 5B**). Interessanterweise führte der PR130-*knockdown* in den PDAC Zelllinien nicht zu einer erhöhten Induktion von HSP70 (s. **Abb. 57B-C, Anhang 5C**). Diese Erkenntnis impliziert, dass die Anwesenheit von PR130 essenziell für eine HSP70 Induktion ist. In Abwesenheit von PR130 kann HSP70 nicht mehr induziert werden, sodass die Vorgänge der Rückfaltung von falsch gefalteten Proteinen und der Verhinderung der Aggregatbildung komplett ausfallen, wodurch diese umso mehr akkumulieren und die Zellen in Apoptose treiben. Auch im epithelialen Subtyp fiel die Induktion von HSP70 durch die Abwesenheit von PR130 aus (**Anhang 5C**). Das zeigt erneut, dass dieser Subtyp biochemisch ebenfalls auf PD reagiert und die PD-abhängigen Signalwege auslöst, diese jedoch keine tödlichen Effekte mit sich bringen. Es ist daran zu erinnern, dass die murinen Zelllinien nur als Modell angesehen werden können. In den humanen PDAC Zelllinien führte der PD-bedingte Abbau von PR130 in allen Fällen, ungeachtet vom epithelialen oder mesenchymalen Ursprung, zur Apoptose. Ob die Apoptoseraten dieser Zelllinien mit der Akkumulation von Proteinaggregaten zusammenhängen, bedarf weiterer Analysen. Dieser Zusammenhang konnte stellvertretend nur in den MIA PaCA-2 Zellen analysiert (s. **Abb. 56, 57**). Dennoch gibt es Grund zu Annahme, dass in allen getesteten humanen Zelllinien derselbe Mechanismus durch PD ausgelöst wird.

Diese Ergebnisse zeigen auch, dass Zellen mit hohen PR130 Spiegel besonders auf dieses Protein angewiesen ist. Da eine erhöhte Expression von PR130 mit der Aggressivität von PDAC und schlechten Überlebenschancen der PatientInnen korreliert, zeigt der Angriff auf dieses Protein die Verwundbarkeit dieses Subtyps und liefert somit einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz gegen die Bekämpfung dieser schwer behandelbaren Krebsart.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden auch MIA PaCA-2 PR130-*knockout* Zellen untersucht, welche über das CRISPR-CAS9 Verfahren generiert wurden (**Anhang 9**). Abgesehen von dem Klon 9, ist es gelungen die Expression von PR130 komplett zu unterdrücken, ohne die anderen PP2A-Untereinheiten zu beeinflussen. Allerdings zeigten diese PR130 negativen Zellen ein adaptives Verhalten, sodass PD-bedingte Effekte nach einigen Passagen nicht mehr reproduzierbar waren. Das zeigt, dass eine transiente Transfektion für die Charakterisierung von PR130-abhängigen Effekte besser geeignet war.

6.4. Die Inhibierung von PP2A und der WEE1-Kinase resultiert in einer mitotischen Katastrophe

Eine Hemmung von PP2A zeigte in der bisherigen Analyse bereits vielversprechende Effekte in der Induktion von Apoptose. Dabei wurde der PP2Ai PD verwendet, welcher insbesondere die Überlebenswege der Zelle und die Zellen im Zellzyklus antreibt, um so Apoptose zu induzieren. Um nun mehr auf Zellzyklus-Effekte einzugehen, wird PD zusammen mit dem WEE1-Inhibitor MK-1775 in PDAC und in Leukämiezellen untersucht. Durch die Behandlung der PBMCs mit PD und MK-1775, konnte eine unspezifische Toxizität dieser Kombinationstherapie ausgeschlossen werden (s. **Abb. 64**).

WEE1 ist ein Protein, welches den G2/M-Übergang überwacht und somit den Eintritt in die Mitose kontrolliert [234-236]. Wird WEE1 inhibiert, so kann der MPF-Komplex nicht gehemmt werden, wodurch Zellen unkontrolliert in die Mitose eintreten. Das Resultat ist der Zelltod durch eine mitotische Katastrophe. Eine Hemmung von WEE1 durch MK-1775 hat demnach einen sehr ähnlichen Effekt wie eine PP2A-Hemmung durch PD, wodurch eine Kombination dieser beiden Inhibitoren synergistische Wirkungen hervorrufen sollte.

In der Tat konnte in MIA PaCA-2 und in S821 (muriner epithelialer Subtyp) Zellen diese Synergie beobachtet werden (s. **Abb. 59, 61**). Wie erwartet akkumulierten MIA PaCA-2 Zellen in der G2/M-Phase in der PD und MK-1775 Einzelbehandlung. Eine Kombination dieser beiden Inhibitoren führte zu einem schlagartigen Anstieg in der SubG1-Phase, während die G2/M-Population wieder abnahm. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zellen, die zuvor in der G2/M-Phase arretierten, sich nun in der SubG1-Phase befinden. Durch die Abwesenheit von p-CDK1 im Immunoblot konnte die erfolgreiche Hemmung von WEE1 verifiziert werden (s. **Abb. 60B, 61F**).

Selbstverständlich traten die PD-bedingten Effekte in den S821 Zellen trotz hoher PD Konzentrationen erst nach 72 h ein, da diese Zellen eine weitestgehende Resistenz gegen diesen PP2Ai aufzeigte (s. **Kap. 5.4.3, Abb. 61**). Nach 48 h konnte PD nur in Kombination mit MK-1775 die Apoptose in S821 Zellen induzieren, was die Synergie dieser beiden Inhibitoren erneut unterstreicht.

Durch die Langzeitexperimente konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das epi/mes Modell in den murinen PDAC Zellen hier an seine Grenzen kommt, da epitheliale Zelllinien nach langen Zeitwerten ebenso auf PD reagieren. Es ist bemerkenswert, dass die Zelltodraten dennoch sehr schwach ausfielen.

Eine Studie aus dem Jahre 2009 konnte ebenfalls die synergistische Wirkung von LB100 in Doxorubicin und Temozolomid in Glioblastomzellen nachweisen [500]. Es wurde hierbei gezielt PP2A inhibiert, da die Aktivität von PLK1 und Aurora direkt durch PP2A negativ kontrolliert werden [501]. Ebenfalls ist bekannt, dass PLK1 in vielen Krebsarten überexprimiert ist [502], was dazu führt, dass Zellzyklus-abhängige Kontrollpunkte trotz genomischer Instabilität umgangen werden und Krebszellen somit überleben [501]. Durch die PP2A-Inhibierung wird PLK1 zusätzlich aktiviert, was dazu führt, dass eine Einzelbehandlung mit LB100 die Zellen in eine mitotische Katastrophe zwingen [501]. In MIA PaCA-2 Zellen zeigte PD in der Einzelbehandlung ebenfalls Anzeichen einer mitotischen Katastrophe, da das α -Tubulin hier eine abnormale Form annimmt. Diese morphologischen Veränderungen des α -Tubulins konnte ebenfalls in MK-1775 behandelte Zellen beobachtet werden, was ebenfalls zu erwarten war. In der Kombinationsbehandlung scheint das α -Tubulin aus den Zellkernen auszutreten und sich um die Zellkerne zu legen, wobei oftmals auch mehrere Zellkerne eingeschlossen werden (s. **Abb. 60**).

PLK1 nimmt in MIA PaCA-2 Zellen, sowohl in der Immunfluoreszenz als auch in der Western Blot Analyse, durch die Behandlung mit PD und MK-1775, ab (s. **Abb. 60B-D**). Dieses Ergebnis deutet möglicherweise auf die Zunahme von p-PLK1, seiner aktivierten Form [241-244], hin. Passend zu diesem Resultat wurde in PLK1-*knockdown* Zellen eine verringerte Zellproliferation beobachtet, die mit einer verringerten Lebensfähigkeit und einer Induktion der Caspase-abhängigen Apoptose einhergingen [503]. Tatsächlich waren die Isoformen der Caspase-3 in der Kombinationsbehandlung PD + MK-1775 am deutlichsten zu erkennen (s. **Abb. 59D**). Wird dieses Ereignis zusammen mit den Bildern aus den mikroskopischen Analysen betrachtet, so liegt die Vermutung nahe, dass PD und MK-1775 in einer Einzelbehandlung eine mitotische Katastrophe induzieren, diese aber in der Kombinationsbehandlung durch eine Apoptose überlagert wird. Es kann dennoch spekuliert werden, dass in der Kombinationstherapie PD + MK-1775 beide Zelltodmechanismen parallel ablaufen, was die rasant ansteigende Zelltodrate erklären würde. Es ist bekannt, dass die mitotische Katastrophe abhängig von der Caspase-2 abläuft [319]. Eine Detektion dieser Caspase hätte einen parallelen Vorgang beider Zelltodmechanismen nachweisen können.

Aus den diskutierten Ergebnissen dieser Dissertation und dem Wissen aus der Literatur, scheint eine Abnahme von PLK1 direkt mit der Apoptose zusammenzuhängen [243, 503, 504]. Es ist also nicht verwunderlich, dass die Ser/Thr-Kinase PLK1 weiter in den Fokus der Krebsforschung rückt und eine Verwendung von PLK- Inhibitoren immer mehr an Relevanz gewinnt [505, 506]. Dennoch könnte die Detektion von p-PLK1, p-CDC25 (Ser198) [245, 246] und p-WEE1 zur Unterstützung der beschriebenen Resultate maßgeblich beitragen.

Nun stellt sich die Frage wie die Mechanismen einer HSP70 Induktion und einer mitotischen Katastrophe im PDAC Zellsystem zusammenhängen. Sicherlich können beide Vorgänge nicht separat voneinander betrachtet werden. Es kommt daher auf die gegebenen Konditionen an. Mit 3 μ M PD kann ein Zellzyklusarrest nach 24 h in der G2/M-Phase (s. **Abb. 41, 42**) nicht gewährleistet werden (mit Ausnahme der BxPC-3 Zellen), wodurch eine HSP70 Induktion vermutlich dominiert, was wiederum zu einer toxischen Proteinaggregation führt und in einer Apoptose endet. Bei der niedrigeren Dosis von 1 μ M PD kommt es zu einem G2/M-Arrest in den PDAC Zellen (s. **Abb. 41, 42, 59**), wodurch zunächst eine mitotische Katastrophe verursacht wird (s. **Abb. 60**).

Interessanterweise wurde in Prostatakarzinomzellen bereits HSPA9 (Mortalin) mit einer mitotischen Katastrophe in Verbindung gebracht [507]. HSPA9 ist ein Mitglied der HSP70-Familie und interagiert direkt mit dem Oberflächenprotein CD9. Dieses wurde als ein Marker für Krebsstammzellen in PDAC [508], Glioblastom [509] und AML [510] beschrieben. Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte Expression von CD9 direkt mit schlechterem Überleben der AML-KrebspatientInnen korreliert [511], wobei das Antigen CD9 eine Rolle in zahlreichen zellulären Prozessen, wie der Zelladhäsion, -mobilisation, -differenzierung, -proliferation, der Apoptose und der Chemotherapieresistenz, spielt [509, 512]. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass eine Überexprimierung von CD9, sowohl im PDAC Zellsystem als auch in AML-Zellen, eine zentrale Rolle bei der Induktion der mitotischen Katastrophe übernimmt.

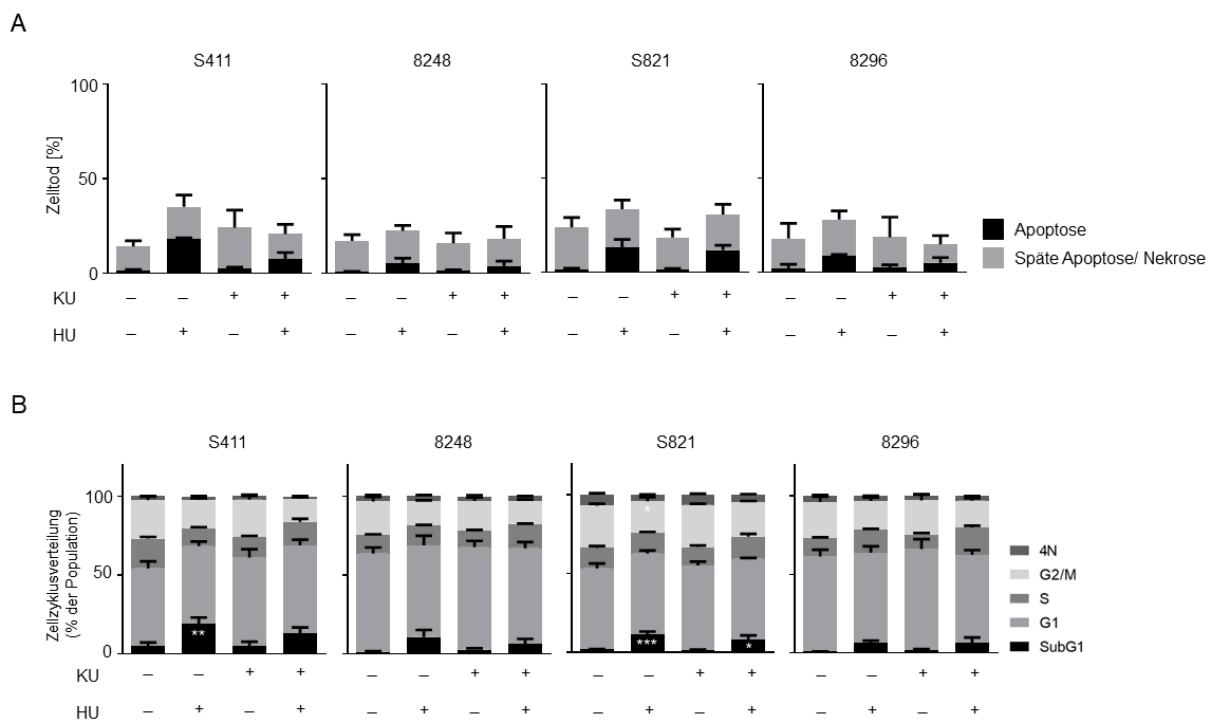
Die Auswirkungen von PD und MK-1775 wurden ebenfalls in Leukämiezellen überprüft. Die PD-Einzelbehandlung führte in RS4-11 Zellen nach 24 h zu keinem G2/M-Arrest (s. **Anhang 7D**), jedoch fand eine Induktion der Apoptose nach diesem Zeitwert dennoch statt (s. **Abb. 44B**). Die PD-bedingten Effekte in MV4-11 Zellen waren ähnlich zu den beschriebenen Effekten in RS4-11 Zellen (s. **Abb. 44A, Anhang 7B**). In einer Langzeitanalyse (72 h) wurde jedoch hohe Apoptoseraten in MV4-11, RS4-11 und RAMOS Zellen verzeichnet (s. **Abb. 45**). Die zytotoxischen Effekte von PD in leukämische Zellen waren somit unumstritten. Ob die eintretende Apoptose in diesen Zellen mit einem PD-bedingten Abbau von PR130 (wie in PDAC Zellen) zusammenhängt, bedarf weiterer Analysen. Allerdings wurde bisher noch keine Verbindung zwischen PPP2R3A/PR130 in Leukämieerkrankungen postuliert, während andere B-Untereinheiten von PP2A, wie PPP2R5A oder PPP2R3B, in AML-Zellen im Vergleich zu normalen Blutzellen verringert exprimiert sind [513]. Daher könnte eine Charakterisierung von PR130 in Leukämiezellen innovativ für die Krebsforschung sein.

Der WEE1-Inhibitor MK-1775 führte in MV4-11 und RS4-11 Zellen nicht zur Akkumulation in der G2/M-Phase (s. **Abb. 63, Anhang 7**), stattdessen konnte in RS4-11 Zellen ein G1-Arrest beobachtet werden. Mit einer Dosis von 500 nM MK-1775 konnte dieser G1-Arrest jedoch nicht mehr nachgewiesen werden (s. **Abb. 63**). Dieses Resultat war überraschend, da WEE1 ein Protein des G2/M-Restriktionspunkts ist.

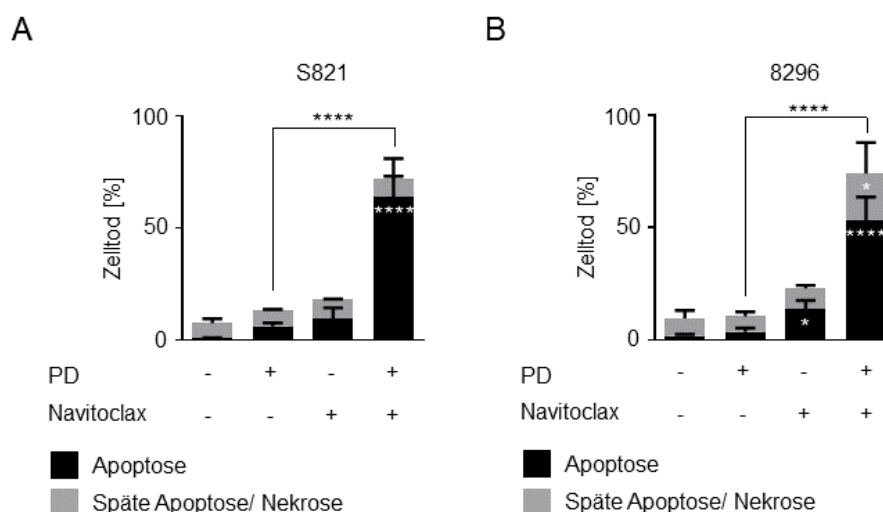
Auch in MV4-11 Zellen konnte eine signifikante Abnahme der G1-Phase gemessen werden, welcher mit einer hohen SubG1-Population einherging. Das zeigt, dass die getesteten leukämischen Zellen bereits nach 24 h empfindlich auf MK-1775 reagierten. Die Kombination von PD + MK-1775 zeigte in MV4-11 und RS4-11 Zellen in der Zelltodanalyse synergistische Effekte (s. **Abb. 63, Anhang 7C**), was die synergistische Wirkung eines PP2Ai und einem WEE1-Inhibitor verdeutlicht. Die erfolgreiche Hemmung von WEE1 wurde zusätzlich durch die Abwesenheit von p-CDK1 verifiziert (**Anhang 8**).

Eine eintretende mitotische Katastrophe durch PD oder MK-1775 konnte in AML und ALL Zellen bis zum aktuellen Stand der Ergebnislage nicht eindeutig nachgewiesen werden, wodurch diese Thematik definitiv weiterer Analysen bedarf.

7. Anhang

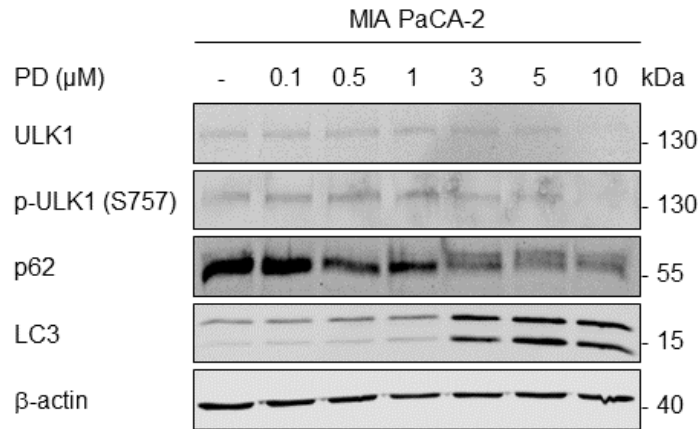


Anhang 1: FACS Analysen zeigen die Auswirkungen von HU und KU-60019 auf die Zellzyklusverteilung und die Apoptose-assoziierte DNA-Fragmentierung. (A) Die Zelllinien S411, 8248, S821 und 8296 wurden 24 h mit 5 μ M KU-60019 und 1 mM HU behandelt. Der Zelltod wurde mittels Durchflusszytometrie und Annexin-V/PI-Färbung analysiert; $n = 3$. (B) Die Zelllinien S411, 8248, S821 und 8296 wurden 24 h mit 5 μ M KU-60019 und 1 mM HU behandelt. Die Zellzyklusverteilung und die SubG1-Population wurden mittels Durchflusszytometrie an PI-gefärbten Zellen gemessen; $n = 3$. Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).



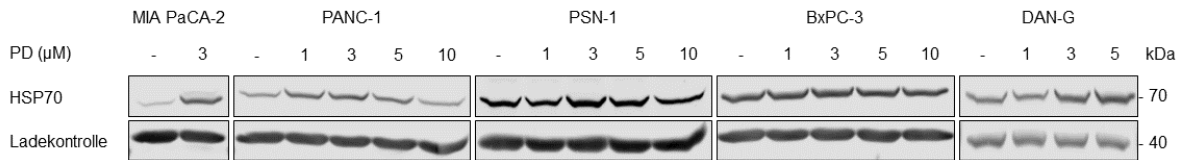
Anhang 2: Die Kombination aus PD und Navitoclax führt die PD-resistenten epithelialen PDAC Zellen in den Zelltod. Die murinen epithelialen PDAC Zelllinien (A) S821 und (B) 8296 wurden mit 5 μ M PD und 5 μ M Navitoclax behandelt und für weitere 24 h inkubiert. Eine FACS Analyse von Annexin-V/PI gefärbten Zellen erfolgte nach Beendigung der Inkubationszeit. Die signifikante Zunahme in (A) und (B) beziehen sich auf Zellpopulationen in der Frühapoptose/Apoptose; $n = 3$. Die Daten aus (A) und (B) werden als Mittelwerte \pm SD dargestellt; Statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$).

A



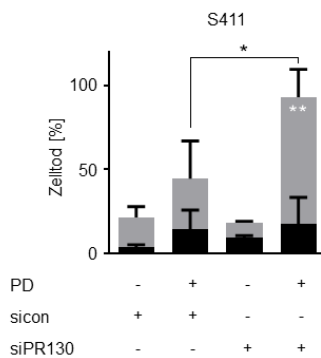
Anhang 3: **PD induziert Autophagie in MIA PaCA-2 Zellen.** (A) MIA PaCA-2 Zellen wurden mit einer Dosisreihe von 0.1 – 10 μM PD behandelt und für weitere 24 h kultiviert. Nach der Ernte wurden die Zellen lysiert und im Western Blot analysiert. Es wurden ULK1, p62, LC3 und p-ULK1 S757 detektiert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Ladung wurde β-Actin detektiert; n = 3.

A

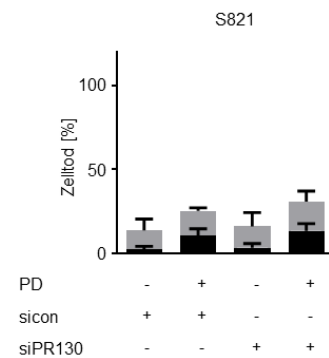


Anhang 4: **HSP70 in humanen PDAC Zelllinien.** (A) Die MIA PaCA-2 Zellen wurden mit 3 μM PD behandelt, während die PANC-1, PSN-1, BxPC-3 und DAN-G mit einer Dosisreihe von 1 – 10 μM PD kultiviert wurden. Die Lysate wurden nach 24 h Inkubationszeit erstellt und analysiert; n = 2, n (MIA PaCA-2) > 3.

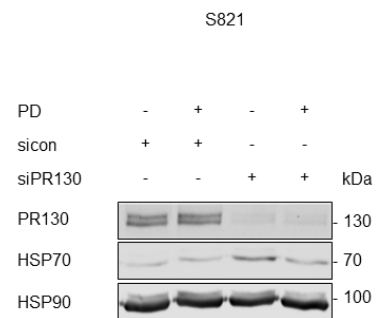
A



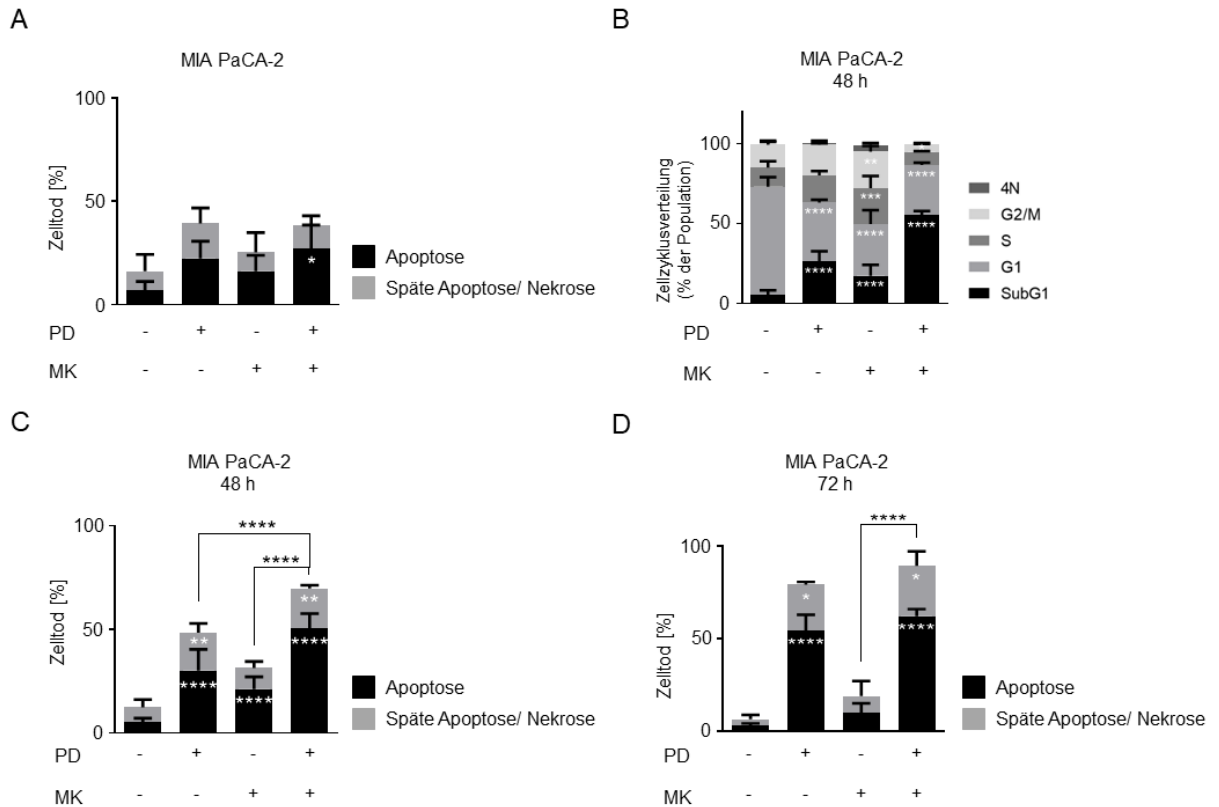
B



C

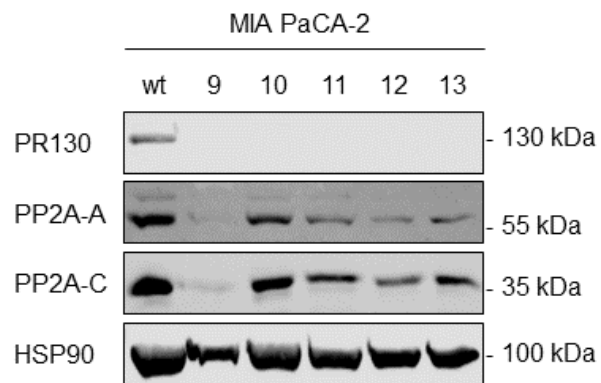


Anhang 5: **Ein Knockdown von PR130 erhöht den zytotoxischen Effekt von PD in den PD sensitiven Zelllinie S411.** Knockdown von PR130 (A) in S411 und (B) in 8296 Zellen wurde, wie in Abb. 57 beschrieben, durchgeführt. Die S411 Zellen wurden mit 2 μM PD, während die S821 Zellen mit 3 μM PD behandelt. Es erfolgte im Anschluss die Ernte, und die Färbung der Zellen mit Annexin/PI. Eine durchflusszytometrische Analyse wurde durchgeführt; n = 2. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD angegeben; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* p < 0,05, ** p < 0,01). (C) Zur Verifizierung des Knockdowns wurde ein Immunoblot mit den Zellen aus (B) durchgeführt. PR130 und HSP70 wurden detektiert. HSP90 diente als Ladekontrolle; n = 2.



Anhang 6: Die Kombination aus PD und MK-1775 führt zu Apoptose assoziierte DNA-Fragmentierung in MIA PaCA-2 Zellen. (A) MIA PaCA-2 Zellen wurden für 24 h mit 3 μ M PD und 500 nM MK-1775 behandelt. Die Detektion von Annexin-V/PI positiven Zellen am Durchflusszytometer erfolgte unmittelbar nach der Ernte; $n = 3$. (B) MIA PaCA-2 Zellen wurden mit 2 μ M PD und 500 nM MK-1775 für 48 h behandelt. Eine Detektion von PI positiven Zellen am Durchflusszytometer wurde durchgeführt; $n = 3$. (C) MIA PaCA-2 Zellen wurden mit 2 μ M PD und 500 nM MK-1775 für 48 h behandelt. Der Zelltod wurde mittels Durchflusszytometrie und Annexin-V/PI-Färbung analysiert; $n = 3$. (D) Die Zellen wurden wie in (C) beschrieben behandelt und analysiert. Die Detektion von Annexin/PI positiven Zellen wurde durchflusszytometrisch nach 72 h erfasst; $n = 3$. Die Signifikanzen zwischen den Balken in (C) und (D) beziehen sich auf die Frühapoptose. Alle Daten (A) - (D) sind angegeben als Mittelwerte \pm SD; statistische Analysen mit Hilfe einer Varianzanalyse (two-way ANOVA) wurden durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

A



Anhang 9: Verifizierung der CRISPR-Cas9 MIA PaCA-2 PR130-knockout Zellen im Immunoblot. MIA PaCA-2 Zellen wurden ausgesät und mit sgRNA gegen PR130 sowie GFP-gekoppeltes Cas9 transfiziert. Die Zellen wurden anschließend nach GFP-positiven Zellen sortiert, um Einzelklone zu generieren. Nachdem die Klone angewachsen sind, wurde der PR130-knockout, sowie die PP2A-A und PP2A-C Expressionen mittels Western Blot Analyse verifiziert. HSP90 diente als Ladekontrolle; n = 3.

8. Literaturverzeichnis

1. Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 719-724.
2. Nunney, L., *Lineage selection and the evolution of multistage carcinogenesis*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 1999. **266**(1418): p. 493-498.
3. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Cancer genes and the pathways they control*. Nature medicine, 2004. **10**(8): p. 789-799.
4. Tollis, M., A.K. Schneider-Utaka, and C.C. Maley, *The evolution of human cancer gene duplications across mammals*. Molecular biology and evolution, 2020. **37**(10): p. 2875-2886.
5. Basu, A.K., *DNA damage, mutagenesis and cancer*. International journal of molecular sciences, 2018. **19**(4): p. 970.
6. Tallen, G. and K. Riabowol, *DisorderING promotes epigenetic order*. FEBS Lett, 2017. **591**: p. 257-259.
7. Aigner, K., et al., *Was ist eine maligne Erkrankung?* Onkologie Basiswissen, 2016: p. 3-13.
8. Zucal, I., et al., *Indocyanine Green for Leakage Control in Isolated Limb Perfusion*. Journal of Personalized Medicine, 2021. **11**(11): p. 1152.
9. Siegel, R.L., et al., *Cancer statistics, 2023*. Ca Cancer J Clin, 2023. **73**(1): p. 17-48.
10. Beger, H.G., et al., *Treatment of pancreatic cancer: challenge of the facts*. World journal of surgery, 2003. **27**: p. 1075-1084.
11. Sarantis, P., et al., *Pancreatic ductal adenocarcinoma: Treatment hurdles, tumor microenvironment and immunotherapy*. World journal of gastrointestinal oncology, 2020. **12**(2): p. 173.
12. Ghaneh, P., E. Costello, and J.P. Neoptolemos, *Biology and management of pancreatic cancer*. Postgraduate medical journal, 2008. **84**(995): p. 478-497.
13. Goral, V., *Pancreatic cancer: pathogenesis and diagnosis*. Asian Pacific journal of cancer prevention, 2015. **16**(14): p. 5619-5624.
14. Rahib, L., et al., *Estimated projection of US cancer incidence and death to 2040*. JAMA Network Open, 2021. **4**(4): p. e214708-e214708.
15. McGuigan, A., et al., *Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes*. World journal of gastroenterology, 2018. **24**(43): p. 4846.
16. Kleeff, J., et al., *Pancreatic cancer*. Nature reviews Disease primers, 2016. **2**(1): p. 1-22.
17. Porta, M., et al., *Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage*. Clinical and Translational Oncology, 2005. **7**: p. 189-197.
18. De Souza, A., et al., *Metformin and pancreatic cancer: Is there a role?* Cancer chemotherapy and pharmacology, 2016. **77**: p. 235-242.
19. Khorana, A.A., *Cancer and coagulation*. American journal of hematology, 2012. **87**(S1): p. S82-S87.
20. Loveday, B.P., L. Lipton, and B.N. Thomson, *Pancreatic cancer: An update on diagnosis and management*. Australian journal of general practice, 2019. **48**(12): p. 826-831.

21. Oettle, H., et al., *Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial*. *Jama*, 2007. **297**(3): p. 267-277.
22. Smithy, J.W. and E.M. O'Reilly, *Pancreas cancer: therapeutic trials in metastatic disease*. *Journal of surgical oncology*, 2021. **123**(6): p. 1475-1488.
23. Vienot, A., et al., *FOLFOXIRI vs FOLFIRINOX as first-line chemotherapy in patients with advanced pancreatic cancer: A population-based cohort study*. *World journal of gastrointestinal oncology*, 2020. **12**(3): p. 332.
24. Conroy, T., et al., *FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer*. *New England journal of medicine*, 2011. **364**(19): p. 1817-1825.
25. Conroy, T., et al., *FOLFIRINOX or gemcitabine as adjuvant therapy for pancreatic cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2018. **379**(25): p. 2395-2406.
26. Neumaier, J., *FOLFOXIRI als Alternative bei Pankreaskarzinom*. 2016, Springer.
27. Ansari, D., A. Gustafsson, and R. Andersson, *Update on the management of pancreatic cancer: surgery is not enough*. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2015. **21**(11): p. 3157.
28. Adamska, A., A. Domenichini, and M. Falasca, *Pancreatic ductal adenocarcinoma: current and evolving therapies*. *International journal of molecular sciences*, 2017. **18**(7): p. 1338.
29. Evan, T., V.M.-Y. Wang, and A. Behrens, *The roles of intratumour heterogeneity in the biology and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Oncogene*, 2022. **41**(42): p. 4686-4695.
30. Gorunova, L., et al., *Cytogenetic analysis of pancreatic carcinomas: intratumor heterogeneity and nonrandom pattern of chromosome aberrations*. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 1998. **23**(2): p. 81-99.
31. Campbell, P.J., et al., *The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer*. *Nature*, 2010. **467**(7319): p. 1109-1113.
32. Yachida, S., et al., *Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer*. *Nature*, 2010. **467**(7319): p. 1114-1117.
33. Waters, A.M. and C.J. Der, *KRAS: the critical driver and therapeutic target for pancreatic cancer*. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2017: p. a031435.
34. Canon, J., et al., *The clinical KRAS (G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity*. *Nature*, 2019. **575**(7781): p. 217-223.
35. Ying, H., et al., *Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Genes & development*, 2016. **30**(4): p. 355-385.
36. Matthaei, H., et al., *Cystic precursors to invasive pancreatic cancer*. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 2011. **8**(3): p. 141-150.
37. DelGiorno, K.E., et al., *Identification and manipulation of biliary metaplasia in pancreatic tumors*. *Gastroenterology*, 2014. **146**(1): p. 233-244. e5.
38. Bailey, J.M., et al., *DCLK1 marks a morphologically distinct subpopulation of cells with stem cell properties in preinvasive pancreatic cancer*. *Gastroenterology*, 2014. **146**(1): p. 245-256.
39. Hermann, P.C., et al., *Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer*. *Cell stem cell*, 2007. **1**(3): p. 313-323.
40. Li, C., et al., *Identification of pancreatic cancer stem cells*. *Cancer research*, 2007. **67**(3): p. 1030-1037.

41. Rhim, A.D., et al., *EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation*. Cell, 2012. **148**(1): p. 349-361.
42. Dardare, J., et al., *Epithelial to mesenchymal transition in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma: State-of-the-art and therapeutic opportunities*. Pharmaceuticals, 2021. **14**(8): p. 740.
43. Dangi-Garimella, S., et al., *Epithelial-mesenchymal transition and pancreatic cancer progression*. 2012.
44. Kim, D.H., et al., *Epithelial mesenchymal transition in embryonic development, tissue repair and cancer: a comprehensive overview*. Journal of clinical medicine, 2017. **7**(1): p. 1.
45. Zheng, H. and Y. Kang, *Multilayer control of the EMT master regulators*. Oncogene, 2014. **33**(14): p. 1755-1763.
46. Zhou, X.-m., H. Zhang, and X. Han, *Role of epithelial to mesenchymal transition proteins in gynecological cancers: pathological and therapeutic perspectives*. Tumor Biology, 2014. **35**(10): p. 9523-9530.
47. Seita, J. and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine, 2010. **2**(6): p. 640-653.
48. Ogawa, M., *Hematopoiesis*. Journal of allergy and clinical immunology, 1994. **94**(3): p. 645-650.
49. Robb, L., *Cytokine receptors and hematopoietic differentiation*. Oncogene, 2007. **26**(47): p. 6715-6723.
50. Laurenti, E. and B. Göttgens, *From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes*. Nature, 2018. **553**(7689): p. 418-426.
51. Königshoff, M. and T. Brandenburger, *Kurzlehrbuch Biochemie*. 2018: Georg Thieme Verlag.
52. Alam, R., *A brief review of the immune system*. Primary Care: Clinics in Office Practice, 1998. **25**(4): p. 727-738.
53. Parkin, J. and B. Cohen, *An overview of the immune system*. The Lancet, 2001. **357**(9270): p. 1777-1789.
54. Sattler, S., *The role of the immune system beyond the fight against infection*. The immunology of cardiovascular homeostasis and pathology, 2017: p. 3-14.
55. Nicholson, L.B., *The immune system*. Essays in biochemistry, 2016. **60**(3): p. 275-301.
56. McComb, S., et al., *Introduction to the immune system*. Immunoproteomics: Methods and Protocols, 2019: p. 1-24.
57. Mazzurana, L., et al. *The roles for innate lymphoid cells in the human immune system*. in *Seminars in Immunopathology*. 2018. Springer.
58. Cooper, M.D. and M.N. Alder, *The evolution of adaptive immune systems*. Cell, 2006. **124**(4): p. 815-822.
59. Fletcher, J.M., et al., *T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis*. Clinical & Experimental Immunology, 2010. **162**(1): p. 1-11.
60. Chitnis, T., *The role of CD4 T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis*. International review of neurobiology, 2007. **79**: p. 43-72.
61. Sędek, Ł., et al., *The immunophenotypes of blast cells in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: How different are they from their normal counterparts?* Cytometry Part B: Clinical Cytometry, 2014. **86**(5): p. 329-339.
62. Tenen, D.G., et al., *Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia*. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 1997. **90**(2): p. 489-519.

63. Bader, P. and T. Klingebiel, *Leukämien*. Pädiatrie: Grundlagen und Praxis, 2007: p. 1295-1302.
64. Witherspoon, R.P., et al., *Secondary cancers after bone marrow transplantation for leukemia or aplastic anemia*. New England Journal of Medicine, 1989. **321**(12): p. 784-789.
65. Logan, C., D. Koura, and R. Taplitz, *Updates in infection risk and management in acute leukemia*. Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book, 2020. **2020**(1): p. 135-139.
66. Lad, D., A. Jain, and S. Varma, *Complications and management of coagulation disorders in leukemia patients*. Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy, 2017: p. 61-72.
67. Chojnowski, K., et al., *Assessment of coagulation disorders in patients with acute leukemia before and after cytostatic treatment*. Leukemia & Lymphoma, 1999. **36**(1-2): p. 77-84.
68. Povinelli, B.J., A. Rodriguez-Meira, and A.J. Mead, *Single cell analysis of normal and leukemic hematopoiesis*. Molecular aspects of medicine, 2018. **59**: p. 85-94.
69. Vetrie, D., G.V. Helgason, and M. Copland, *The leukaemia stem cell: similarities, differences and clinical prospects in CML and AML*. Nature Reviews Cancer, 2020. **20**(3): p. 158-173.
70. Redaelli, A., et al., *The burden and outcomes associated with four leukemias: AML, ALL, CLL and CML*. Expert review of anticancer therapy, 2003. **3**(3): p. 311-329.
71. Sasaki, K., et al., *De novo acute myeloid leukemia: a population-based study of outcome in the United States based on the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database, 1980 to 2017*. Cancer, 2021. **127**(12): p. 2049-2061.
72. Shimony, S., M. Stahl, and R.M. Stone, *Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management*. American Journal of Hematology, 2023. **98**(3): p. 502-526.
73. Hochhaus, A., et al., *Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia*. Leukemia, 2009. **23**(6): p. 1054-1061.
74. Hochhaus, A., et al., *Long-term outcomes of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia*. New England Journal of Medicine, 2017. **376**(10): p. 917-927.
75. Deutzmann, R., R. Netzker, and J. Rassow, *Duale Reihe Biochemie*. 2012: Georg Thieme Verlag.
76. Bhullar, K.S., et al., *Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions*. Molecular cancer, 2018. **17**: p. 1-20.
77. Lagunas-Rangel, F.A. and V. Chávez-Valencia, *FLT3-ITD and its current role in acute myeloid leukaemia*. Medical oncology, 2017. **34**: p. 1-13.
78. Hunter, T. and J.A. Cooper, *Protein-tyrosine kinases*. Annual review of biochemistry, 1985. **54**(1): p. 897-930.
79. Mahajan, K. and N.P. Mahajan, *Cross talk of tyrosine kinases with the DNA damage signaling pathways*. Nucleic acids research, 2015. **43**(22): p. 10588-10601.
80. Ferguson, F.M. and N.S. Gray, *Kinase inhibitors: the road ahead*. Nature reviews Drug discovery, 2018. **17**(5): p. 353-377.
81. Mullard, A., *Phosphatases start shedding their stigma of undruggability*. Nature reviews Drug discovery, 2018. **17**(12): p. 847-850.

82. Brautigam, D.L., C. Farrington, and G. Narla, *Targeting protein phosphatase PP2A for cancer therapy: development of allosteric pharmaceutical agents*. *Clinical Science*, 2021. **135**(13): p. 1545-1556.
83. Dzulko, M., et al., *The PP2A subunit PR130 is a key regulator of cell development and oncogenic transformation*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 2020. **1874**(2): p. 188453.
84. Haanen, T.J., C.M. O'Connor, and G. Narla, *Biased holoenzyme assembly of Protein Phosphatase 2A (PP2A): from cancer to small molecules*. *Journal of Biological Chemistry*, 2022. **298**(12).
85. Ronk, H., et al., *Targeting PP2A for cancer therapeutic modulation*. *Cancer Biology & Medicine*, 2022. **19**(10): p. 1428-1439.
86. Göder, A., et al., *HDAC1 and HDAC2 integrate checkpoint kinase phosphorylation and cell fate through the phosphatase-2A subunit PR130*. *Nature communications*, 2018. **9**(1): p. 764.
87. Kalev, P., et al., *Loss of PPP2R2A inhibits homologous recombination DNA repair and predicts tumor sensitivity to PARP inhibition*. *Cancer research*, 2012. **72**(24): p. 6414-6424.
88. Yan, Y., et al., *Protein phosphatase 2A has an essential role in the activation of γ -irradiation-induced G2/M checkpoint response*. *Oncogene*, 2010. **29**(30): p. 4317-4329.
89. Goodarzi, A.A., et al., *Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A*. *The EMBO journal*, 2004. **23**(22): p. 4451-4461.
90. Sontag, J.-M. and E. Sontag, *Protein phosphatase 2A dysfunction in Alzheimer's disease*. *Frontiers in molecular neuroscience*, 2014. **7**: p. 16.
91. Crispín, J.C., C.M. Hedrich, and G.C. Tsokos, *Gene-function studies in systemic lupus erythematosus*. *Nature reviews rheumatology*, 2013. **9**(8): p. 476-484.
92. Kowluru, A. and A. Matti, *Hyperactivation of protein phosphatase 2A in models of glucolipotoxicity and diabetes: potential mechanisms and functional consequences*. *Biochemical pharmacology*, 2012. **84**(5): p. 591-597.
93. Ruvolo, P.P., *The broken "Off" switch in cancer signaling: PP2A as a regulator of tumorigenesis, drug resistance, and immune surveillance*. *BBA clinical*, 2016. **6**: p. 87-99.
94. Reynhout, S. and V. Janssens, *Physiologic functions of PP2A: Lessons from genetically modified mice*. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2019. **1866**(1): p. 31-50.
95. Duong, F.H., et al., *Protein phosphatase 2A promotes hepatocellular carcinogenesis in the diethylnitrosamine mouse model through inhibition of p53*. *Carcinogenesis*, 2014. **35**(1): p. 114-122.
96. Gong, S.-J., et al., *Upregulation of PP2Ac predicts poor prognosis and contributes to aggressiveness in hepatocellular carcinoma*. *Cancer Biology & Therapy*, 2016. **17**(2): p. 151-162.
97. Yu, S., et al., *PPP2R2D, a regulatory subunit of protein phosphatase 2A, promotes gastric cancer growth and metastasis via mechanistic target of rapamycin activation*. *International Journal of Oncology*, 2018. **52**(6): p. 2011-2020.
98. Sablina, A.A., et al., *Identification of PP2A complexes and pathways involved in cell transformation*. *Cancer research*, 2010. **70**(24): p. 10474-10484.
99. He, J.-J., et al., *High expression of protein phosphatase 2 regulatory subunit B α predicts poor outcome in hepatocellular carcinoma patients after liver transplantation*. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 2021. **13**(7): p. 716.

100. Chen, H., et al., *Protein phosphatase 2 regulatory subunit B"Alpha silencing inhibits tumor cell proliferation in liver cancer*. *Cancer Medicine*, 2019. **8**(18): p. 7741-7753.
101. Deng, X., et al., *Clustering analysis and prognostic model based on PI3K/AKT-related genes in pancreatic cancer*. *Frontiers in Oncology*, 2023. **13**: p. 1112104.
102. Yang, J.Y., et al., *SF3B1 mutation in pancreatic cancer contributes to aerobic glycolysis and tumor growth through a PP2A–c-Myc axis*. *Molecular Oncology*, 2021. **15**(11): p. 3076-3090.
103. Kiely, M. and P.A. Kiely, *PP2A: the wolf in sheep's clothing?* *Cancers*, 2015. **7**(2): p. 648-669.
104. Annunziato, A., *DNA packaging: nucleosomes and chromatin*. *Nature education*, 2008. **1**(1): p. 26.
105. Bannister, A.J. and T. Kouzarides, *Regulation of chromatin by histone modifications*. *Cell research*, 2011. **21**(3): p. 381-395.
106. Seto, E. and M. Yoshida, *Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2014. **6**(4): p. a018713.
107. Lund, A.H. and M. van Lohuizen, *Epigenetics and cancer*. *Genes & development*, 2004. **18**(19): p. 2315-2335.
108. C Mwakwari, S., et al., *Macrocylic histone deacetylase inhibitors*. *Current topics in medicinal chemistry*, 2010. **10**(14): p. 1423-1440.
109. Vigushin, D. and R. Coombes, *Targeted histone deacetylase inhibition for cancer therapy*. *Current cancer drug targets*, 2004. **4**(2): p. 205-218.
110. Krämer, O.H., et al., *The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2*. *The EMBO journal*, 2003. **22**(13): p. 3411-3420.
111. Christmann, M. and B. Kaina, *Epigenetic regulation of DNA repair genes and implications for tumor therapy*. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2019. **780**: p. 15-28.
112. Roos, W.P. and A. Krumm, *The multifaceted influence of histone deacetylases on DNA damage signalling and DNA repair*. *Nucleic acids research*, 2016: p. gkw922.
113. Mouw, K.W., et al., *DNA damage and repair biomarkers of immunotherapy response*. *Cancer discovery*, 2017. **7**(7): p. 675-693.
114. Imai, S.-i., et al., *Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase*. *Nature*, 2000. **403**(6771): p. 795-800.
115. Krämer, O.H., *HDAC2: a critical factor in health and disease*. *Trends in pharmacological sciences*, 2009. **30**(12): p. 647-655.
116. Parbin, S., et al., *Histone deacetylases: a saga of perturbed acetylation homeostasis in cancer*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2014. **62**(1): p. 11-33.
117. Li, Y. and E. Seto, *HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy*. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2016. **6**(10).
118. Drogaris, P., et al., *Histone deacetylase inhibitors globally enhance h3/h4 tail acetylation without affecting h3 lysine 56 acetylation*. *Scientific reports*, 2012. **2**(1): p. 220.
119. Hu, Z., et al., *Histone deacetylase inhibitors promote breast cancer metastasis by elevating NEDD9 expression*. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023. **8**(1): p. 11.
120. Halkidou, K., et al., *Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer*. *The Prostate*, 2004. **59**(2): p. 177-189.

121. Choi, J.H., et al., *Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues*. Japanese Journal of Cancer Research, 2001. **92**(12): p. 1300-1304.
122. Wilson, A.J., et al., *Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(19): p. 13548-13558.
123. Zhang, Z., et al., *Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast*. Breast cancer research and treatment, 2005. **94**: p. 11-16.
124. Weichert, W., et al., *Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo*. Clinical Cancer Research, 2008. **14**(6): p. 1669-1677.
125. Spiegel, S., S. Milstien, and S. Grant, *Endogenous modulators and pharmacological inhibitors of histone deacetylases in cancer therapy*. Oncogene, 2012. **31**(5): p. 537-551.
126. Yang, X.-J. and E. Seto, *The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men*. Nature reviews Molecular cell biology, 2008. **9**(3): p. 206-218.
127. Thiagalingam, S., et al., *Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2003. **983**(1): p. 84-100.
128. Lucio-Eterovic, A.K., et al., *Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hypoexpressed in glioblastomas*. BMC cancer, 2008. **8**(1): p. 1-10.
129. New, M., H. Olzscha, and N.B. La Thangue, *HDAC inhibitor-based therapies: can we interpret the code?* Molecular oncology, 2012. **6**(6): p. 637-656.
130. Wang, Z.-Y., W. Qin, and F. Yi, *Targeting histone deacetylases: perspectives for epigenetic-based therapy in cardio-cerebrovascular disease*. Journal of geriatric cardiology: JGC, 2015. **12**(2): p. 153.
131. Leus, N.G., et al., *HDAC1-3 inhibitor MS-275 enhances IL10 expression in RAW264. 7 macrophages and reduces cigarette smoke-induced airway inflammation in mice*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 45047.
132. Kim, H.-J. and S.-C. Bae, *Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs*. American journal of translational research, 2011. **3**(2): p. 166.
133. Blattmann, C., et al., *Enhancement of radiation response in osteosarcoma and rhabdomyosarcoma cell lines by histone deacetylase inhibition*. International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics, 2010. **78**(1): p. 237-245.
134. Krumm, A., et al., *Enhanced histone deacetylase activity in malignant melanoma provokes RAD51 and FANCD2-triggered drug resistance*. Cancer research, 2016. **76**(10): p. 3067-3077.
135. Zhang, F., et al., *Sensitization to γ -irradiation-induced cell cycle arrest and apoptosis by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells*. Cancer biology & therapy, 2009. **8**(9): p. 823-831.
136. Cao, L.-L., C. Shen, and W.-G. Zhu, *Histone modifications in DNA damage response*. Science China Life Sciences, 2016. **59**: p. 257-270.
137. Ryan, Q.C., et al., *Phase I and pharmacokinetic study of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, in patients with advanced and refractory solid tumors or lymphoma*. Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(17): p. 3912-3922.

138. Kummar, S., et al., *Phase I trial of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, administered weekly in refractory solid tumors and lymphoid malignancies*. *Clinical Cancer Research*, 2007. **13**(18): p. 5411-5417.
139. Gojo, I., et al., *Phase 1 and pharmacologic study of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, in adults with refractory and relapsed acute leukemias*. *Blood*, 2007. **109**(7): p. 2781-2790.
140. Gore, L., et al., *A phase I and pharmacokinetic study of the oral histone deacetylase inhibitor, MS-275, in patients with refractory solid tumors and lymphomas*. *Clinical Cancer Research*, 2008. **14**(14): p. 4517-4525.
141. Lindahl, T. and D. Barnes. *Repair of endogenous DNA damage*. in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2000. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
142. Jackson, S.P. and J. Bartek, *The DNA-damage response in human biology and disease*. *Nature*, 2009. **461**(7267): p. 1071-1078.
143. Tubbs, A. and A. Nussenzweig, *Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer*. *Cell*, 2017. **168**(4): p. 644-656.
144. Harrison, J.C. and J.E. Haber, *Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint*. *Annu. Rev. Genet.*, 2006. **40**: p. 209-235.
145. Harper, J.W. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: ten years after*. *Molecular cell*, 2007. **28**(5): p. 739-745.
146. Vilenchik, M.M. and A.G. Knudson, *Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. **100**(22): p. 12871-12876.
147. VanderVeen, L.A., et al., *Induction of frameshift and base pair substitution mutations by the major DNA adduct of the endogenous carcinogen malondialdehyde*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. **100**(24): p. 14247-14252.
148. Haber, J.E., *DNA recombination: the replication connection*. *Trends in biochemical sciences*, 1999. **24**(7): p. 271-275.
149. Kaina, B., *DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling*. *Biochemical pharmacology*, 2003. **66**(8): p. 1547-1554.
150. Cimprich, K.A. and D. Cortez, *ATR: an essential regulator of genome integrity*. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2008. **9**(8): p. 616-627.
151. Suzuki, K., S. Kodama, and M. Watanabe, *Recruitment of ATM protein to double strand DNA irradiated with ionizing radiation*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(36): p. 25571-25575.
152. Lee, J.-H. and T.T. Paull, *ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex*. *Science*, 2005. **308**(5721): p. 551-554.
153. Zou, L. and S.J. Elledge, *Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes*. *Science*, 2003. **300**(5625): p. 1542-1548.
154. Callén, E., et al., *Essential role for DNA-PKcs in DNA double-strand break repair and apoptosis in ATM-deficient lymphocytes*. *Molecular cell*, 2009. **34**(3): p. 285-297.
155. Hartlerode, A.J., et al., *Recruitment and activation of the ATM kinase in the absence of DNA-damage sensors*. *Nature structural & molecular biology*, 2015. **22**(9): p. 736-743.
156. Roos, W.P., A.D. Thomas, and B. Kaina, *DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology*. *Nature Reviews Cancer*, 2016. **16**(1): p. 20-33.

157. Vilar, J.B., M. Christmann, and M.T. Tomicic, *Alterations in molecular profiles affecting glioblastoma resistance to radiochemotherapy: where does the good go?* *Cancers*, 2022. **14**(10): p. 2416.
158. Kumari, R. and P. Jat, *Mechanisms of cellular senescence: cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype*. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2021. **9**: p. 485.
159. Roos, W.P. and B. Kaina, *DNA damage-induced cell death by apoptosis*. *Trends in molecular medicine*, 2006. **12**(9): p. 440-450.
160. Qiu, S. and J. Huang, *MRN complex is an essential effector of DNA damage repair*. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 2021. **22**(1): p. 31-37.
161. Christmann, M., et al., *Mechanisms of human DNA repair: an update*. *Toxicology*, 2003. **193**(1-2): p. 3-34.
162. Hosoya, N. and K. Miyagawa, *Targeting DNA damage response in cancer therapy*. *Cancer science*, 2014. **105**(4): p. 370-388.
163. Lee, J. and T. Paull, *Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks*. *Oncogene*, 2007. **26**(56): p. 7741-7748.
164. Smith, J., et al., *The ATM–Chk2 and ATR–Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer*. *Advances in cancer research*, 2010. **108**: p. 73-112.
165. Scully, R. and A. Xie, *Double strand break repair functions of histone H2AX*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2013. **750**(1-2): p. 5-14.
166. Abdel-Malek, Z.A., A.L. Kadekaro, and V.B. Swope, *Stepping up melanocytes to the challenge of UV exposure*. *Pigment cell & melanoma research*, 2010. **23**(2): p. 171-186.
167. Hanasoge, S. and M. Ljungman, *H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(11): p. 2298-2304.
168. Ciccia, A. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: making it safe to play with knives*. *Molecular cell*, 2010. **40**(2): p. 179-204.
169. Rothkamm, K., et al., *DNA damage foci: Meaning and significance*. *Environmental and molecular mutagenesis*, 2015. **56**(6): p. 491-504.
170. Zou, Y., et al., *Functions of human replication protein A (RPA): from DNA replication to DNA damage and stress responses*. *Journal of cellular physiology*, 2006. **208**(2): p. 267-273.
171. Zeman, M.K. and K.A. Cimprich, *Causes and consequences of replication stress*. *Nature cell biology*, 2014. **16**(1): p. 2-9.
172. Dobbstein, M. and C.S. Sørensen, *Exploiting replicative stress to treat cancer*. *Nature reviews Drug discovery*, 2015. **14**(6): p. 405-423.
173. Li, Z., A.H. Pearlman, and P. Hsieh, *DNA mismatch repair and the DNA damage response*. *DNA repair*, 2016. **38**: p. 94-101.
174. Matsuoka, S., et al., *ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage*. *science*, 2007. **316**(5828): p. 1160-1166.
175. Jazayeri, A., et al., *ATM-and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks*. *Nature cell biology*, 2006. **8**(1): p. 37-45.
176. Zhou, Y., et al., *Regulation of the DNA damage response by DNA-PKcs inhibitory phosphorylation of ATM*. *Molecular cell*, 2017. **65**(1): p. 91-104.
177. Stiff, T., et al., *ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling*. *The EMBO journal*, 2006. **25**(24): p. 5775-5782.
178. Sirbu, B.M. and D. Cortez, *DNA damage response: three levels of DNA repair regulation*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2013. **5**(8): p. a012724.

179. Loughery, J., et al., *Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters*. Nucleic acids research, 2014. **42**(12): p. 7666-7680.
180. Hu, W., Z. Feng, and A.J. Levine, *The regulation of multiple p53 stress responses is mediated through MDM2*. Genes & cancer, 2012. **3**(3-4): p. 199-208.
181. Pitolli, C., et al., *p53-mediated tumor suppression: DNA-damage response and alternative mechanisms*. Cancers, 2019. **11**(12): p. 1983.
182. Clarke, A., et al., *Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 849-852.
183. Lowe, S.W., et al., *p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 847-849.
184. Matt, S. and T.G. Hofmann, *The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016. **73**: p. 2829-2850.
185. Zohny, S.F., et al., *p21 Waf1/Cip1: Its paradoxical effect in the regulation of breast cancer*. Breast Cancer, 2019. **26**: p. 131-137.
186. Bartek, J. and J. Lukas, *Mammalian G1-and S-phase checkpoints in response to DNA damage*. Current opinion in cell biology, 2001. **13**(6): p. 738-747.
187. Georgakilas, A.G., O.A. Martin, and W.M. Bonner, *p21: a two-faced genome guardian*. Trends in molecular medicine, 2017. **23**(4): p. 310-319.
188. Levrero, M., et al., *The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions*. Journal of cell science, 2000. **113**(10): p. 1661-1670.
189. Rivlin, N., et al., *Mutations in the p53 tumor suppressor gene: important milestones at the various steps of tumorigenesis*. Genes & cancer, 2011. **2**(4): p. 466-474.
190. Rich, T., R.L. Allen, and A.H. Wyllie, *Defying death after DNA damage*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 777-783.
191. van Wijk, L.M., et al., *RAD51 as a functional biomarker for homologous recombination deficiency in cancer: a promising addition to the HRD toolbox?* Expert review of molecular diagnostics, 2022. **22**(2): p. 185-199.
192. Prakash, R., et al., *Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2015. **7**(4): p. a016600.
193. Han, J. and J. Huang, *DNA double-strand break repair pathway choice: the fork in the road*. Genome Instability & Disease, 2020. **1**(1): p. 10-19.
194. Kolberg, M., et al., *Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2004. **1699**(1-2): p. 1-34.
195. Musiałek, M.W. and D. Rybaczek, *Hydroxyurea—The good, the bad and the ugly*. Genes, 2021. **12**(7): p. 1096.
196. Vassallo, C., et al., *Muco-cutaneous changes during long-term therapy with hydroxyurea in chronic myeloid leukaemia*. Clinical and experimental dermatology, 2001. **26**(2): p. 141-148.
197. Hehlmann, R., *Current CML therapy: progress and dilemma*. Leukemia, 2003. **17**(6): p. 1010-1012.
198. Nevitt, S.J., A.P. Jones, and J. Howard, *Hydroxyurea (hydroxycarbamide) for sickle cell disease*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2017(4).
199. Shewach, D.S. and T.S. Lawrence, *Antimetabolite radiosensitizers*. Journal of Clinical Oncology, 2007. **25**(26): p. 4043-4050.

200. Brignole, E.J., et al., *3.3-Å resolution cryo-EM structure of human ribonucleotide reductase with substrate and allosteric regulators bound*. *Elife*, 2018. **7**: p. e31502.
201. Eriksson, M., et al., *Binding of allosteric effectors to ribonucleotide reductase protein R1: reduction of active-site cysteines promotes substrate binding*. *Structure*, 1997. **5**(8): p. 1077-1092.
202. Chatzidavid, S., et al., *The Clinical and Prognostic Significance of Ribonucleotide Reductase Subunits RRM1 and RRM2 mRNA Levels in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia*. *Clinical Hematology International*, 2023: p. 1-9.
203. Lassmann, G., L. Thelander, and A. Gräslund, *EPR stopped-flow studies of the reaction of the tyrosyl radical of protein R2 from ribonucleotide reductase with hydroxyurea*. *Biochemical and biophysical research communications*, 1992. **188**(2): p. 879-887.
204. Zhou, B., et al., *A small-molecule blocking ribonucleotide reductase holoenzyme formation inhibits cancer cell growth and overcomes drug resistance*. *Cancer research*, 2013. **73**(21): p. 6484-6493.
205. Chen, M.-C., et al., *The novel ribonucleotide reductase inhibitor COH29 inhibits DNA repair in vitro*. *Molecular pharmacology*, 2015. **87**(6): p. 996-1005.
206. Robert, J. and L. Rivory, *Pharmacology of irinotecan*. *Drugs of Today* (Barcelona, Spain: 1998), 1998. **34**(9): p. 777-803.
207. Pizzolato, J.F. and L.B. Saltz, *Irinotecan (Campto®) in the treatment of pancreatic cancer*. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 2003. **3**(5): p. 587-593.
208. Sandler, A., *Irinotecan therapy for small-cell lung cancer*. *Oncology* (Williston Park, NY), 2002. **16**(4): p. 419-25, 428, 433; discussion 433.
209. Reyhanoglu, G. and T. Smith, *Irinotecan*. 2020.
210. Pourquier, P. and Y. Pommier, *Topoisomerase I-mediated DNA damage*. 2001.
211. Kciuk, M., B. Marciniak, and R. Kontek, *Irinotecan—still an important player in cancer chemotherapy: a comprehensive overview*. *International journal of molecular sciences*, 2020. **21**(14): p. 4919.
212. de Man, F.M., et al., *Individualization of irinotecan treatment: a review of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics*. *Clinical pharmacokinetics*, 2018. **57**: p. 1229-1254.
213. Peters, G.J., *Drug resistance in colorectal cancer: General aspects*, in *Drug Resistance in Colorectal Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies*. 2020, Elsevier. p. 1-33.
214. Lee, B., et al., *A novel mechanism of irinotecan targeting MDM2 and Bcl-xL*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2019. **514**(2): p. 518-523.
215. Takeba, Y., et al., *Irinotecan activates p53 with its active metabolite, resulting in human hepatocellular carcinoma apoptosis*. *Journal of pharmacological sciences*, 2007. **104**(3): p. 232-242.
216. Yue, J., et al., *Targeted chemotherapy overcomes drug resistance in melanoma*. *Genes & development*, 2020. **34**(9-10): p. 637-649.
217. Hong, C.S., et al., *LB100, a small molecule inhibitor of PP2A with potent chemo- and radio-sensitizing potential*. *Cancer biology & therapy*, 2015. **16**(6): p. 821-833.
218. Ho, W.S., et al., *LB-100, a novel protein phosphatase 2A (PP2A) inhibitor, sensitizes malignant meningioma cells to the therapeutic effects of radiation*. *Cancer letters*, 2018. **415**: p. 217-226.

219. D'Arcy, B.M., et al., *The antitumor drug LB-100 is a catalytic inhibitor of protein phosphatase 2A (PPP2CA) and 5 (PPP5C) coordinating with the active-site catalytic metals in PPP5C*. *Molecular cancer therapeutics*, 2019. **18**(3): p. 556-566.
220. Wu, M.-Y., et al., *PP2A inhibitors suppress migration and growth of PANC-1 pancreatic cancer cells through inhibition on the Wnt/ β -catenin pathway by phosphorylation and degradation of β -catenin*. *Oncology reports*, 2014. **32**(2): p. 513-522.
221. Fujiki, H., et al., *The concept of the okadaic acid class of tumor promoters is revived in endogenous protein inhibitors of protein phosphatase 2A, SET and CIP2A, in human cancers*. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 2018. **144**: p. 2339-2349.
222. Wang, G., J. Dong, and L. Deng, *Overview of cantharidin and its analogues*. *Current medicinal chemistry*, 2018. **25**(17): p. 2034-2044.
223. Nasmyth, K., *Putting the cell cycle in order*. *Science*, 1996. **274**(5293): p. 1643-1645.
224. Karn, J., et al., *Regulation of cell cycle duration by c-myc levels*. *Oncogene*, 1989. **4**(6): p. 773-787.
225. Darzynkiewicz, Z., et al., *Correlation between cell cycle duration and RNA content*. *Journal of cellular physiology*, 1979. **100**(3): p. 425-438.
226. Zou, T. and Z. Lin, *The involvement of ubiquitination machinery in cell cycle regulation and cancer progression*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021. **22**(11): p. 5754.
227. Vermeulen, K., D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman, *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. *Cell proliferation*, 2003. **36**(3): p. 131-149.
228. Bertoli, C., J.M. Skotheim, and R.A. De Bruin, *Control of cell cycle transcription during G1 and S phases*. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2013. **14**(8): p. 518-528.
229. Cooper, S., *On the proposal of a GO phase and the restriction point*. 1998.
230. Teixeira, L.K. and S.I. Reed, *Ubiquitin ligases and cell cycle control*. *Annual review of biochemistry*, 2013. **82**: p. 387-414.
231. Morgan, D.O., *Principles of CDK regulation*. *Nature*, 1995. **374**(6518): p. 131-134.
232. Nelson, D.M., et al., *Coupling of DNA synthesis and histone synthesis in S phase independent of cyclin/cdk2 activity*. *Molecular and cellular biology*, 2002. **22**(21): p. 7459-7472.
233. Rieder, C.L., *Mitosis in vertebrates: the G2/M and M/A transitions and their associated checkpoints*. *Chromosome Research*, 2011. **19**: p. 291-306.
234. Baldin, V. and B. Ducommun, *Subcellular localisation of human wee1 kinase is regulated during the cell cycle*. *Journal of cell science*, 1995. **108**(6): p. 2425-2432.
235. Heald, R., M. McLoughlin, and F. McKeon, *Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase*. *Cell*, 1993. **74**(3): p. 463-474.
236. Wang, Z., et al., *Expression of CDK1Tyr15, pCDK1Thr161, Cyclin B1 (Total) and pCyclin B1Ser126 in vulvar squamous cell carcinoma and their relations with clinicopathological features and prognosis*. *PLoS One*, 2015. **10**(4): p. e0121398.
237. Perry, J.A. and S. Kornbluth, *Cdc25 and Wee1: analogous opposites?* *Cell division*, 2007. **2**(1): p. 1-12.

238. Graves, P.R., et al., *Localization of human Cdc25C is regulated both by nuclear export and 14-3-3 protein binding*. *Oncogene*, 2001. **20**(15): p. 1839-1851.
239. Zeng, Y., et al., *Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1*. *Nature*, 1998. **395**(6701): p. 507-510.
240. Stanford, J.S. and J.V. Ruderman, *Changes in regulatory phosphorylation of Cdc25C Ser287 and Wee1 Ser549 during normal cell cycle progression and checkpoint arrests*. *Molecular biology of the cell*, 2005. **16**(12): p. 5749-5760.
241. Talati, C., et al., *Polo-like kinase inhibitors in hematologic malignancies*. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2016. **98**: p. 200-210.
242. Bussey, K.J., et al., *Targeting polo-like kinase 1, a regulator of p53, in the treatment of adrenocortical carcinoma*. *Clinical and Translational Medicine*, 2016. **5**: p. 1-14.
243. Kang, G.-Y., et al., *Downregulation of PLK-1 expression in kaempferol-induced apoptosis of MCF-7 cells*. *European journal of pharmacology*, 2009. **611**(1-3): p. 17-21.
244. Jang, Y.-J., et al., *Regulation of polo-like kinase 1 by DNA damage in mitosis: inhibition of mitotic plk-1 by protein phosphatase 2A*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. **282**(4): p. 2473-2482.
245. Toyoshima-Morimoto, F., E. Taniguchi, and E. Nishida, *Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase*. *EMBO reports*, 2002. **3**(4): p. 341-348.
246. Kumagai, A. and W.G. Dunphy, *Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from Xenopus egg extracts*. *Science*, 1996. **273**(5280): p. 1377-1380.
247. Van Vugt, M.A., A. Brás, and R.H. Medema, *Polo-like kinase-1 controls recovery from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells*. *Molecular cell*, 2004. **15**(5): p. 799-811.
248. Qian, Y.-W., et al., *Activated polo-like kinase Plx1 is required at multiple points during mitosis in Xenopus laevis*. *Molecular and cellular biology*, 1998. **18**(7): p. 4262-4271.
249. Lane, H.A. and E.A. Nigg, *Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes*. *The Journal of cell biology*, 1996. **135**(6): p. 1701-1713.
250. Kotani, S., et al., *PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression*. *Molecular cell*, 1998. **1**(3): p. 371-380.
251. Harper, J.W., J.L. Burton, and M.J. Solomon, *The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more*. *Genes & development*, 2002. **16**(17): p. 2179-2206.
252. Hansen, D.V., et al., *Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCF β TrCP-dependent destruction of the APC inhibitor Emi1*. *Molecular biology of the cell*, 2004. **15**(12): p. 5623-5634.
253. Ferreira, L.T., et al., *Dissecting the role of the tubulin code in mitosis*, in *Methods in cell biology*. 2018, Elsevier. p. 33-74.
254. Carrassa, L., et al., *U2OS cells lacking Chk1 undergo aberrant mitosis and fail to activate the spindle checkpoint*. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2009. **13**(8a): p. 1565-1576.
255. Hartwell, L.H. and T.A. Weinert, *Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events*. *Science*, 1989. **246**(4930): p. 629-634.

256. Barnum, K.J. and M.J. O'Connell, *Cell cycle regulation by checkpoints*. Cell cycle control: mechanisms and protocols, 2014: p. 29-40.
257. Iyer, D.R. and N. Rhind, *The intra-S checkpoint responses to DNA damage*. Genes, 2017. **8**(2): p. 74.
258. Schmitz, S. and C. Desel, *Der Experimentator Zellbiologie*. 2018: Springer-Verlag.
259. De Souza, C.P. and S.A. Osmani, *Mitosis, not just open or closed*. Eukaryotic cell, 2007. **6**(9): p. 1521-1527.
260. Kastan, M.B. and J. Bartek, *Cell-cycle checkpoints and cancer*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 316-323.
261. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm*. Nature reviews cancer, 2009. **9**(3): p. 153-166.
262. Fu, S., et al., *Multicenter Phase II Trial of the WEE1 inhibitor adavosertib in refractory solid tumors harboring CCNE1 amplification*. Journal of Clinical Oncology, 2023. **41**(9): p. 1725-1734.
263. Guertin, A.D., et al., *Preclinical evaluation of the WEE1 inhibitor MK-1775 as single-agent anticancer therapy*. Molecular cancer therapeutics, 2013. **12**(8): p. 1442-1452.
264. Stathis, A. and A. Oza, *Targeting Wee1-like protein kinase to treat cancer*. Drug news & perspectives, 2010. **23**(7): p. 425-429.
265. Yan, J., et al., *Inhibitors of cell cycle checkpoint target Wee1 kinase—a patent review (2003–2022)*. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2022. **32**(12): p. 1217-1244.
266. Matheson, C.J., D.S. Backos, and P. Reigan, *Targeting WEE1 kinase in cancer*. Trends in pharmacological sciences, 2016. **37**(10): p. 872-881.
267. De Witt Hamer, P.C., et al., *WEE1 kinase targeting combined with DNA-damaging cancer therapy catalyzes mitotic catastrophe*. Clinical cancer research, 2011. **17**(13): p. 4200-4207.
268. Magnussen, G.I., et al., *High expression of Wee1 is associated with poor disease-free survival in malignant melanoma: potential for targeted therapy*. PloS one, 2012. **7**(6): p. e38254.
269. Kim, H.-Y., et al., *Targeting the WEE1 kinase as a molecular targeted therapy for gastric cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(31): p. 49902.
270. Leijen, S., et al., *Phase I study evaluating WEE1 inhibitor AZD1775 as monotherapy and in combination with gemcitabine, cisplatin, or carboplatin in patients with advanced solid tumors*. Journal of Clinical Oncology, 2016. **34**(36): p. 4371.
271. Kong, A. and H. Mehanna, *WEE1 inhibitor: clinical development*. Current oncology reports, 2021. **23**: p. 1-8.
272. Rajeshkumar, N., et al., *MK-1775, a potent Wee1 inhibitor, synergizes with gemcitabine to achieve tumor regressions, selectively in p53-deficient pancreatic cancer xenografts*. Clinical cancer research, 2011. **17**(9): p. 2799-2806.
273. Raff, M., *Cell suicide for beginners*. Nature, 1998. **396**(6707): p. 119-119.
274. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics*. British journal of cancer, 1972. **26**(4): p. 239-257.
275. Adrain, C., E.M. Creagh, and S.J. Martin, *Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2*. The EMBO journal, 2001. **20**(23): p. 6627-6636.

276. Lee, E.-W., et al., *The roles of FADD in extrinsic apoptosis and necroptosis*. BMB reports, 2012. **45**(9): p. 496-508.
277. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicologic pathology, 2007. **35**(4): p. 495-516.
278. Popgeorgiev, N., L. Jabbour, and G. Gillet, *Subcellular localization and dynamics of the Bcl-2 family of proteins*. Frontiers in cell and developmental biology, 2018. **6**: p. 13.
279. Adrain, C. and S.J. Martin, *The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas*. Trends in biochemical sciences, 2001. **26**(6): p. 390-397.
280. Cain, K., et al., *Apaf-1 oligomerizes into biologically active ~ 700-kDa and inactive ~ 1.4-MDa apoptosome complexes*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(9): p. 6067-6070.
281. Yu, L. and S. Liu. *Autophagy contributes to modulating the cytotoxicities of Bcl-2 homology domain-3 mimetics*. in *Seminars in cancer biology*. 2013. Elsevier.
282. Slee, E.A., et al., *Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD-FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32*. Biochemical Journal, 1996. **315**(1): p. 21-24.
283. Li, X., et al., *The caspase inhibitor Z-VAD-FMK alleviates endotoxic shock via inducing macrophages necroptosis and promoting MDSCs-mediated inhibition of macrophages activation*. Frontiers in immunology, 2019. **10**: p. 1824.
284. Chauvier, D., et al., *Broad-spectrum caspase inhibitors: from myth to reality?* Cell Death & Differentiation, 2007. **14**(2): p. 387-391.
285. Guey, B., et al., *Caspase-1 autoproteolysis is differentially required for NLRP1b and NLRP3 inflammasome function*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(48): p. 17254-17259.
286. Py, B.F., et al., *Caspase-11 controls interleukin-1 β release through degradation of TRPC1*. Cell reports, 2014. **6**(6): p. 1122-1128.
287. Smith, W.M. and D.R. Reed, *Targeting Apoptosis in ALL*. Current Hematologic Malignancy Reports, 2022. **17**(2): p. 53-60.
288. Zhu, Y., et al., *Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors*. Aging cell, 2016. **15**(3): p. 428-435.
289. Tahir, S.K., et al., *Identification of expression signatures predictive of sensitivity to the Bcl-2 family member inhibitor ABT-263 in small cell lung carcinoma and leukemia/lymphoma cell lines*. Molecular cancer therapeutics, 2010. **9**(3): p. 545-557.
290. Joly, F., et al., *A phase II study of Navitoclax (ABT-263) as single agent in women heavily pretreated for recurrent epithelial ovarian cancer: The MONAVI-GINECO study*. Gynecologic Oncology, 2022. **165**(1): p. 30-39.
291. Tolcher, A.W., et al., *Safety, efficacy, and pharmacokinetics of navitoclax (ABT-263) in combination with erlotinib in patients with advanced solid tumors*. Cancer chemotherapy and pharmacology, 2015. **76**: p. 1025-1032.
292. Pullarkat, V.A., et al., *Venetoclax and navitoclax in combination with chemotherapy in patients with relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia and lymphoblastic lymphoma*. Cancer discovery, 2021. **11**(6): p. 1440-1453.
293. Wu, M., A. Akinleye, and X. Zhu, *Novel agents for chronic lymphocytic leukemia*. Journal of hematology & oncology, 2013. **6**: p. 1-8.
294. Budhraja, A., et al., *Modulation of navitoclax sensitivity by dihydroartemisinin-mediated MCL-1 repression in BCR-ABL+ B-lineage acute lymphoblastic leukemia*. Clinical Cancer Research, 2017. **23**(24): p. 7558-7568.

295. Kivioja, J.L., et al., *Dasatinib and navitoclax act synergistically to target NUP98-NSD1+/FLT3-ITD+ acute myeloid leukemia*. *Leukemia*, 2019. **33**(6): p. 1360-1372.
296. Mukherjee, N., et al., *MCL1 inhibitors S63845/MIK665 plus Navitoclax synergistically kill difficult-to-treat melanoma cells*. *Cell death & disease*, 2020. **11**(6): p. 443.
297. Kour, S., et al., *CDK5 inhibitor downregulates Mcl-1 and sensitizes pancreatic cancer cell lines to navitoclax*. *Molecular pharmacology*, 2019. **96**(4): p. 419-429.
298. Khalid, N. and M. Azimpouran, *Necrosis*. 2020.
299. D'arcy, M.S., *Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy*. *Cell biology international*, 2019. **43**(6): p. 582-592.
300. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. *Cell death & differentiation*, 2009. **16**(1): p. 3-11.
301. Ruffolo, P.R., *The Pathogenesis of Necrosis: I. Correlated Light and Electron Microscopic Observations of the Myocardial Necrosis Induced by the Intravenous Injection of Papain*. *The American Journal of Pathology*, 1964. **45**(5): p. 741.
302. Lum, J.J., et al., *Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis*. *Cell*, 2005. **120**(2): p. 237-248.
303. González-Polo, R.-A., et al., *The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death*. *Journal of cell science*, 2005. **118**(14): p. 3091-3102.
304. Feng, Y., et al., *The machinery of macroautophagy*. *Cell research*, 2014. **24**(1): p. 24-41.
305. Nakatogawa, H., et al., *Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast*. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2009. **10**(7): p. 458-467.
306. Egan, D., et al., *The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR*. *Autophagy*, 2011. **7**(6): p. 643-644.
307. Kim, J., et al., *AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1*. *Nature cell biology*, 2011. **13**(2): p. 132-141.
308. Egan, D.F., et al., *Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy*. *Science*, 2011. **331**(6016): p. 456-461.
309. Klionsky, D.J., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy*. *autophagy*, 2021. **17**(1): p. 1-382.
310. Kabeya, Y., et al., *LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing*. *The EMBO journal*, 2000. **19**(21): p. 5720-5728.
311. Wu, J., et al., *Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B—two novel markers of autophagosome*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2006. **339**(1): p. 437-442.
312. Johansen, T. and T. Lamark, *Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins*. *Autophagy*, 2011. **7**(3): p. 279-296.
313. Hansen, M., D.C. Rubinsztein, and D.W. Walker, *Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms*. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2018. **19**(9): p. 579-593.
314. Yang, Z.J., et al., *The role of autophagy in cancer: therapeutic implications*. *Molecular cancer therapeutics*, 2011. **10**(9): p. 1533-1541.

315. Yang, Z. and D.J. Klionsky, *An overview of the molecular mechanism of autophagy*. *Autophagy in infection and immunity*, 2009: p. 1-32.
316. Pascolo, S., *Time to use a dose of Chloroquine as an adjuvant to anti-cancer chemotherapies*. *European journal of pharmacology*, 2016. **771**: p. 139-144.
317. Ye, H., et al., *Chloroquine, an autophagy inhibitor, potentiates the radiosensitivity of glioma initiating cells by inhibiting autophagy and activating apoptosis*. *BMC neurology*, 2016. **16**(1): p. 1-8.
318. Chen, T., et al., *Chloroquine alleviates etoposide-induced centrosome amplification by inhibiting CDK2 in adrenocortical tumor cells*. *Oncogenesis*, 2015. **4**(12): p. e180-e180.
319. Castedo, M., et al., *Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition*. *Oncogene*, 2004. **23**(16): p. 2825-2837.
320. Driessens, G., et al., *Micronuclei to detect in vivo chemotherapy damage in a p53 mutated solid tumour*. *British journal of cancer*, 2003. **89**(4): p. 727-729.
321. Nabha, S.M., et al., *Combretastatin-A4 prodrug induces mitotic catastrophe in chronic lymphocytic leukemia cell line independent of caspase activation and poly (ADP-ribose) polymerase cleavage*. *Clinical cancer research*, 2002. **8**(8): p. 2735-2741.
322. Joza, N., et al., *Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death*. *Nature*, 2001. **410**(6828): p. 549-554.
323. Chen, Z., et al., *Human Chk1 expression is dispensable for somatic cell death and critical for sustaining G2 DNA damage checkpoint*. *Molecular cancer therapeutics*, 2003. **2**(6): p. 543-548.
324. Bunz, F., et al., *Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage*. *Science*, 1998. **282**(5393): p. 1497-1501.
325. Roninson, I.B., E.V. Broude, and B.-D. Chang, *If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells*. *Drug Resistance Updates*, 2001. **4**(5): p. 303-313.
326. Chan, T.A., et al., *14-3-3 σ is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage*. *Nature*, 1999. **401**(6753): p. 616-620.
327. Rosenzweig, R., et al., *The Hsp70 chaperone network*. *Nature reviews molecular cell biology*, 2019. **20**(11): p. 665-680.
328. Mosser, D.D. and R.I. Morimoto, *Molecular chaperones and the stress of oncogenesis*. *Oncogene*, 2004. **23**(16): p. 2907-2918.
329. Doong, H., et al., *CAIR-1/BAG-3 abrogates heat shock protein-70 chaperone complex-mediated protein degradation: accumulation of poly-ubiquitinated Hsp90 client proteins*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(31): p. 28490-28500.
330. Wang, Z., et al., *Mechanism and complex roles of HSC70 in viral infections*. *Frontiers in microbiology*, 2020. **11**: p. 1577.
331. Fan, C.-Y., S. Lee, and D.M. Cyr, *Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40*. *Cell stress & chaperones*, 2003. **8**(4): p. 309.
332. Rauch, J.N., E.R. Zuiderweg, and J.E. Gestwicki, *Non-canonical interactions between heat shock cognate protein 70 (Hsc70) and Bcl2-associated anthanogene (BAG) co-chaperones are important for client release*. *Journal of Biological Chemistry*, 2016. **291**(38): p. 19848-19857.
333. Groemping, Y., et al., *Regulation of ATPase and chaperone cycle of DnaK from *Thermus thermophilus* by the nucleotide exchange factor GrpE*. *Journal of molecular biology*, 2001. **305**(5): p. 1173-1183.
334. Radons, J., *The human HSP70 family of chaperones: where do we stand?* *Cell Stress and Chaperones*, 2016. **21**(3): p. 379-404.

335. Morimoto, R.I., *Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging*. Genes & development, 2008. **22**(11): p. 1427-1438.
336. Shamovsky, I. and E. Nudler, *New insights into the mechanism of heat shock response activation*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008. **65**: p. 855-861.
337. Masayuki, O., *A 70-kDa heat shock cognate protein suppresses the defects caused by a proteasome mutation in Saccharomyces cerevisiae*. FEBS letters, 1994. **351**(2): p. 263-266.
338. Srinivasan, S.R., et al., *Heat shock protein 70 (Hsp70) suppresses RIP1-dependent apoptotic and necroptotic cascades*. Molecular cancer research, 2018. **16**(1): p. 58-68.
339. Albakova, Z., et al., *HSP70 multi-functionality in cancer*. Cells, 2020. **9**(3): p. 587.
340. Rohde, M., et al., *Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms*. Genes & development, 2005. **19**(5): p. 570-582.
341. Calderwood, S.K., et al., *Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis*. Trends in biochemical sciences, 2006. **31**(3): p. 164-172.
342. Guo, F., et al., *Abrogation of heat shock protein 70 induction as a strategy to increase antileukemia activity of heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-demethoxy geldanamycin*. Cancer research, 2005. **65**(22): p. 10536-10544.
343. Li, X., et al., *Validation of the Hsp70–Bag3 protein–protein interaction as a potential therapeutic target in cancer*. Molecular cancer therapeutics, 2015. **14**(3): p. 642-648.
344. Yaglom, J.A., et al., *Cancer cell responses to Hsp70 inhibitor JG-98: Comparison with Hsp90 inhibitors and finding synergistic drug combinations*. Scientific reports, 2018. **8**(1): p. 3010.
345. Tyedmers, J., A. Mogk, and B. Bukau, *Cellular strategies for controlling protein aggregation*. Nature reviews Molecular cell biology, 2010. **11**(11): p. 777-788.
346. Hartl, F.U., A. Bracher, and M. Hayer-Hartl, *Molecular chaperones in protein folding and proteostasis*. Nature, 2011. **475**(7356): p. 324-332.
347. Chiti, F. and C.M. Dobson, *Protein misfolding, functional amyloid, and human disease*. Annu. Rev. Biochem., 2006. **75**: p. 333-366.
348. Kaye, R., et al., *Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis*. Science, 2003. **300**(5618): p. 486-489.
349. Ross, C.A. and M.A. Poirier, *Protein aggregation and neurodegenerative disease*. Nature medicine, 2004. **10**(Suppl 7): p. S10-S17.
350. Stolz, A. and D.H. Wolf, *Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2010. **1803**(6): p. 694-705.
351. Kirkin, V., et al., *A role for ubiquitin in selective autophagy*. Molecular cell, 2009. **34**(3): p. 259-269.
352. Wolf, D.H. and W. Hilt, *The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2004. **1695**(1-3): p. 19-31.
353. Kravtsova-Ivantsiv, Y., T. Sommer, and A. Ciechanover, *The lysine48-based polyubiquitin chain proteasomal signal: Not a single child anymore*. Angewandte Chemie International Edition, 2013. **52**(1): p. 192-198.
354. Buac, D., et al., *From bortezomib to other inhibitors of the proteasome and beyond*. Current pharmaceutical design, 2013. **19**(22): p. 4025-4038.

355. Li, Y., et al., *Investigation the mechanism of the apoptosis induced by lactacystin in gastric cancer cells*. Tumor Biology, 2015. **36**: p. 3465-3470.
356. Huseby, N.-E., C. Ravuri, and U. Moens, *The proteasome inhibitor lactacystin enhances GSH synthesis capacity by increased expression of antioxidant components in an Nrf2-independent, but p38 MAPK-dependent manner in rat colorectal carcinoma cells*. Free radical research, 2016. **50**(1): p. 1-13.
357. Sidor-Kaczmarek, J., et al., *Proteasome inhibitors against amelanotic melanoma*. Cell Biology and Toxicology, 2017. **33**: p. 557-573.
358. Qi, M. and E.A. Elion, *MAP kinase pathways*. Journal of cell science, 2005. **118**(16): p. 3569-3572.
359. Raman, M., W. Chen, and M. Cobb, *Differential regulation and properties of MAPKs*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3100-3112.
360. Keshet, Y. and R. Seger, *The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions*. MAP Kinase Signaling Protocols: Second Edition, 2010: p. 3-38.
361. Cuevas, B., A. Abell, and G. Johnson, *Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3159-3171.
362. Morrison, D.K., *MAP kinase pathways*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2012. **4**(11): p. a011254.
363. Roskoski Jr, R., *Targeting ERK1/2 protein-serine/threonine kinases in human cancers*. Pharmacological research, 2019. **142**: p. 151-168.
364. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 949-954.
365. McCubrey, J.A., et al., *Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2007. **1773**(8): p. 1263-1284.
366. Barbato, M.I., et al., *FDA Approval Summary: Dabrafenib in Combination with Trametinib for BRAF V600E Mutation–Positive Low-Grade Glioma*. Clinical Cancer Research, 2023: p. OF1-OF6.
367. Robert, C., et al., *Five-year outcomes with dabrafenib plus trametinib in metastatic melanoma*. New England Journal of Medicine, 2019. **381**(7): p. 626-636.
368. Planchard, D., et al., *Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAFV600E-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial*. The Lancet Oncology, 2016. **17**(7): p. 984-993.
369. Liu, P., et al., *Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus*. Nature, 2014. **508**(7497): p. 541-545.
370. Barra, F., et al., *Investigational PI3K/AKT/mTOR inhibitors in development for endometrial cancer*. Expert opinion on investigational drugs, 2019. **28**(2): p. 131-142.
371. Rascio, F., et al., *The pathogenic role of PI3K/AKT pathway in cancer onset and drug resistance: An updated review*. Cancers, 2021. **13**(16): p. 3949.
372. Fruman, D.A. and C. Rommel, *PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities*. Nature reviews Drug discovery, 2014. **13**(2): p. 140-156.
373. Osaki, M., M.a. Oshimura, and H. Ito, *PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer*. Apoptosis, 2004. **9**: p. 667-676.
374. Shi, X., et al., *Research progress on the PI3K/AKT signaling pathway in gynecological cancer*. Molecular medicine reports, 2019. **19**(6): p. 4529-4535.
375. Castellano, E. and J. Downward, *RAS interaction with PI3K: more than just another effector pathway*. Genes & cancer, 2011. **2**(3): p. 261-274.

376. Franke, T.F., et al., *Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3, 4-bisphosphate*. *Science*, 1997. **275**(5300): p. 665-668.
377. Alessi, D.R., et al., *Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α* . *Current biology*, 1997. **7**(4): p. 261-269.
378. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. *Science*, 2005. **307**(5712): p. 1098-1101.
379. Feng, J., et al., *Identification of a PKB/Akt Hydrophobic Motif Ser-473 Kinase as DNA-dependent Protein Kinase**. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(39): p. 41189-41196.
380. Toulany, M., et al., *Akt1 and Akt3 but not Akt2 through interaction with DNA-PKcs stimulate proliferation and post-irradiation cell survival of K-RAS-mutated cancer cells*. *Cell death discovery*, 2017. **3**(1): p. 1-10.
381. Kale, J., et al., *Phosphorylation switches Bax from promoting to inhibiting apoptosis thereby increasing drug resistance*. *EMBO reports*, 2018. **19**(9): p. e45235.
382. Kim, J. and K.-L. Guan, *mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth*. *Nature cell biology*, 2019. **21**(1): p. 63-71.
383. Hornsveld, M., et al. *Re-evaluating the role of FOXOs in cancer*. in *Seminars in cancer biology*. 2018. Elsevier.
384. Martorana, F., et al., *AKT inhibitors: new weapons in the fight against breast cancer?* *Frontiers in Pharmacology*, 2021. **12**: p. 662232.
385. Mueller, S., et al., *Evolutionary routes and KRAS dosage define pancreatic cancer phenotypes*. *Nature*, 2018. **554**(7690): p. 62-68.
386. Berrozpe, G., et al., *Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer*. *International journal of cancer*, 1994. **58**(2): p. 185-191.
387. Tan, M.H., et al., *Characterization of a new primary human pancreatic tumor line*. *Cancer investigation*, 1986. **4**(1): p. 15-23.
388. Caldas, C., et al., *Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma*. *Nature genetics*, 1994. **8**(1): p. 27-32.
389. Deer, E.L., et al., *Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines*. *Pancreas*, 2010. **39**(4): p. 425.
390. Rosewicz, S., E.-O. Riecken, and U. Stier, *Transcriptional regulation of carbonic anhydrase II by retinoic acid in the human pancreatic tumor cell line DANG*. *FEBS letters*, 1995. **368**(1): p. 45-48.
391. Sonkin, D., *Expression signature based on TP53 target genes doesn't predict response to TP53-MDM2 inhibitor in wild type TP53 tumors*. *Elife*, 2015. **4**: p. e10279.
392. Hamidi, H., et al., *KRAS mutational subtype and copy number predict in vitro response of human pancreatic cancer cell lines to MEK inhibition*. *British journal of cancer*, 2014. **111**(9): p. 1788-1801.
393. Moore, P.S., et al., *Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines: analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4*. *Virchows Archiv*, 2001. **439**: p. 798-802.
394. Yunis, A., *Human pancreatic carcinoma (MLAPaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase*. *Int. J. Cancer*, 1977. **19**: p. 218-235.
395. Lieber, M., et al., *Establishment of a continuous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas*. *International journal of cancer*, 1975. **15**(5): p. 741-747.

396. Yamada, H., et al., *Establishment of a human pancreatic adenocarcinoma cell line (PSN-1) with amplifications of both c-myc and activated c-Ki-ras by a point mutation*. Biochemical and biophysical research communications, 1986. **140**(1): p. 167-173.
397. Bodnar, A.G., et al., *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*. science, 1998. **279**(5349): p. 349-352.
398. Von Burstin, J., et al., *E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex*. Gastroenterology, 2009. **137**(1): p. 361-371. e5.
399. Martin, P. and T. Papayannopoulou, *HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression*. Science, 1982. **216**(4551): p. 1233-1235.
400. Lozzio, C.B. and B.B. Lozzio, *Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome*. 1975.
401. Lange, B., et al., *Growth factor requirements of childhood acute leukemia: establishment of GM-CSF-dependent cell lines*. 1987.
402. Benjamin, D., et al., *Immunoglobulin secretion by cell lines derived from African and American undifferentiated lymphomas of Burkitt's and non-Burkitt's type*. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), 1982. **129**(3): p. 1336-1342.
403. Stong, R.C., et al., *Human acute leukemia cell line with the t (4; 11) chromosomal rearrangement exhibits B lineage and monocytic characteristics*. 1985.
404. Sipos, T. and J.R. Merkel, *Effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin*. Biochemistry, 1970. **9**(14): p. 2766-2775.
405. Huang, H.-L., et al., *Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells*. Journal of biomedical science, 2010. **17**: p. 1-10.
406. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. nature, 1998. **391**(6669): p. 806-811.
407. Heigwer, F., F. Port, and M. Boutros, *RNA interference (RNAi) screening in Drosophila*. Genetics, 2018. **208**(3): p. 853-874.
408. Han, H., *RNA interference to knock down gene expression*. Disease gene identification: methods and protocols, 2018: p. 293-302.
409. Gopalakrishnan, B. and J. Wolff, *siRNA and DNA transfer to cultured cells*. Macromolecular Drug Delivery: Methods and Protocols, 2009: p. 31-52.
410. Chylinski, K., A. Le Rhun, and E. Charpentier, *The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems*. RNA biology, 2013. **10**(5): p. 726-737.
411. Allemailem, K.S., et al., *Current updates of CRISPR/Cas9-mediated genome editing and targeting within tumor cells: an innovative strategy of cancer management*. Cancer Communications, 2022. **42**(12): p. 1257-1287.
412. Ma, Y., L. Zhang, and X. Huang, *Genome modification by CRISPR/Cas9*. The FEBS journal, 2014. **281**(23): p. 5186-5193.
413. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. science, 2012. **337**(6096): p. 816-821.
414. McKinnon, K.M., *Flow cytometry: an overview*. Current protocols in immunology, 2018. **120**(1): p. 5.1. 1-5.1. 11.
415. Rieger, A.M., et al., *Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death*. JoVE (Journal of Visualized Experiments), 2011(50): p. e2597.

416. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V*. Journal of immunological methods, 1995. **184**(1): p. 39-51.
417. Kumar, R., A. Saneja, and A.K. Panda, *An annexin V-FITC—propidium iodide-based method for detecting apoptosis in a non-small cell lung cancer cell line*. Lung Cancer: Methods and Protocols, 2021: p. 213-223.
418. Crowley, L.C., G. Chojnowski, and N.J. Waterhouse, *Measuring the DNA content of cells in apoptosis and at different cell-cycle stages by propidium iodide staining and flow cytometry*. Cold Spring Harbor Protocols, 2016. **2016**(10): p. pdb. prot087247.
419. Øvrebø, J.I. and B.A. Edgar, *Polyploidy in tissue homeostasis and regeneration*. Development, 2018. **145**(14): p. dev156034.
420. Johnston, J.A., C.L. Ward, and R.R. Kopito, *Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins*. The Journal of cell biology, 1998. **143**(7): p. 1883-1898.
421. Velasco, L., et al., *The complex phosphorylation patterns that regulate the activity of Hsp70 and its cochaperones*. International journal of molecular sciences, 2019. **20**(17): p. 4122.
422. Park, J., J. Cho, and E.J. Song, *Ubiquitin–proteasome system (UPS) as a target for anticancer treatment*. Archives of pharmacal research, 2020. **43**: p. 1144-1161.
423. Vargas, J.N.S., et al., *The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals*. Nature reviews Molecular cell biology, 2023. **24**(3): p. 167-185.
424. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
425. Goldring, J.D., *Measuring protein concentration with absorbance, Lowry, Bradford Coomassie blue, or the Smith bicinchoninic acid assay before electrophoresis*. Electrophoretic Separation of Proteins: Methods and Protocols, 2019: p. 31-39.
426. Smith, B., *SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins*. Proteins, 1984: p. 41-55.
427. Al-Tubuly, A.A., *SDS-PAGE and western blotting*. Diagnostic and Therapeutic Antibodies, 2000: p. 391-405.
428. Matsumoto, H., H. Haniu, and N. Komori, *Determination of protein molecular weights on SDS-PAGE*. Electrophoretic Separation of Proteins: Methods and Protocols, 2019: p. 101-105.
429. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. nature, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
430. Hnasko, T.S. and R.M. Hnasko, *The western blot*. ELISA: Methods and Protocols, 2015: p. 87-96.
431. Galati, D.F. and D.J. Asai, *Immunofluorescence Microscopy*. Current Protocols, 2023. **3**(8): p. e842.
432. Lottspeich, F., et al., *Proteomanalyse*, in *Bioanalytik*. 2021, Springer. p. 1013-1063.
433. Ali-Khan, N., X. Zuo, and D.W. Speicher, *Overview of proteome analysis*. Current Protocols in Protein Science, 2002. **30**(1): p. 22.1. 1-22.1. 19.
434. Ong, S.-E. and M. Mann, *Mass spectrometry–based proteomics turns quantitative*. Nature chemical biology, 2005. **1**(5): p. 252-262.
435. Dejung, M., et al., *Quantitative proteomics uncovers novel factors involved in developmental differentiation of Trypanosoma brucei*. PLoS pathogens, 2016. **12**(2): p. e1005439.

436. Kiweler, N., et al., *The histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 are required for the growth and survival of renal carcinoma cells*. Archives of toxicology, 2018. **92**: p. 2227-2243.
437. Perez-Riverol, Y., et al., *The PRIDE database resources in 2022: a hub for mass spectrometry-based proteomics evidences*. Nucleic acids research, 2022. **50**(D1): p. D543-D552.
438. Bug, G., et al., *Clinical trial of valproic acid and all-trans retinoic acid in patients with poor-risk acute myeloid leukemia*. Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society, 2005. **104**(12): p. 2717-2725.
439. Kiweler, N., et al., *Histone deacetylase inhibitors dysregulate DNA repair proteins and antagonize metastasis-associated processes*. Journal of cancer research and clinical oncology, 2020. **146**: p. 343-356.
440. Nguyen, A., et al., *Class 1 histone deacetylases and ataxia-telangiectasia mutated kinase control the survival of murine pancreatic cancer cells upon dNTP depletion*. Cells, 2021. **10**(10): p. 2520.
441. White, D., et al., *The ATM substrate KAP1 controls DNA repair in heterochromatin: regulation by HP1 proteins and serine 473/824 phosphorylation*. Molecular cancer research, 2012. **10**(3): p. 401-414.
442. Golding, S.E., et al., *Improved ATM kinase inhibitor KU-60019 radiosensitizes glioma cells, compromises insulin, AKT and ERK prosurvival signaling, and inhibits migration and invasion*. Molecular cancer therapeutics, 2009. **8**(10): p. 2894-2902.
443. Woo, W., E.T. Carey, and M. Choi, *Spotlight on liposomal irinotecan for metastatic pancreatic cancer: patient selection and perspectives*. OncoTargets and therapy, 2019. **12**: p. 1455.
444. Orth, M., et al., *Pancreatic ductal adenocarcinoma: Biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches*. Radiation Oncology, 2019. **14**(1): p. 1-20.
445. Biederstädt, A., et al., *SUMO pathway inhibition targets an aggressive pancreatic cancer subtype*. Gut, 2020. **69**(8): p. 1472-1482.
446. Mayer, M. and B. Bukau, *Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism*. Cellular and molecular life sciences, 2005. **62**: p. 670-684.
447. Bornheim, R., et al., *A dominant vimentin mutant upregulates Hsp70 and the activity of the ubiquitin-proteasome system, and causes posterior cataracts in transgenic mice*. Journal of cell science, 2008. **121**(22): p. 3737-3746.
448. Pilecka, I., et al., *Recruitment of APPL1 to ubiquitin-rich aggresomes in response to proteasomal impairment*. Experimental cell research, 2011. **317**(8): p. 1093-1107.
449. Do, K., J.H. Doroshow, and S. Kummar, *Wee1 kinase as a target for cancer therapy*. Cell cycle, 2013. **12**(19): p. 3159.
450. Ghelli Luserna Di Rorà, A., et al., *Targeting WEE1 to enhance conventional therapies for acute lymphoblastic leukemia*. Journal of hematology & oncology, 2018. **11**(1): p. 1-18.
451. Senese, S., et al., *Role for histone deacetylase 1 in human tumor cell proliferation*. Molecular and cellular biology, 2007. **27**(13): p. 4784-4795.
452. Bharadwaj, D. and M. Mandal, *Senescence in polyploid giant cancer cells: A road that leads to chemoresistance*. Cytokine & growth factor reviews, 2020. **52**: p. 68-75.
453. Shu, Z., S. Row, and W.-M. Deng, *Endoreplication: the good, the bad, and the ugly*. Trends in cell biology, 2018. **28**(6): p. 465-474.

454. Valieva, Y., et al., *Senescence-associated β -galactosidase detection in pathology*. *Diagnostics*, 2022. **12**(10): p. 2309.
455. Cahu, J. and B. Sola, *A sensitive method to quantify senescent cancer cells*. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2013(78): p. e50494.
456. Chun, S.G., W. Zhou, and N.S. Yee, *Combined targeting of histone deacetylases and hedgehog signaling enhances cytotoxicity in pancreatic cancer*. *Cancer biology & therapy*, 2009. **8**(14): p. 1328-1339.
457. Zhang, S., et al., *Effect of trichostatin a on viability and microRNA expression in human pancreatic cancer cell line BxPC-3*. *Experimental oncology*, 2008.
458. Peulen, O., et al., *The anti-tumor effect of HDAC inhibition in a human pancreas cancer model is significantly improved by the simultaneous inhibition of cyclooxygenase 2*. *PloS one*, 2013. **8**(9): p. e75102.
459. Gottifredi, V., et al., *p53 down-regulates CHK1 through p21 and the retinoblastoma protein*. *Molecular and cellular biology*, 2001. **21**(4): p. 1066-1076.
460. Toledo, L.I., et al., *ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA*. *Cell*, 2013. **155**(5): p. 1088-1103.
461. Panagopoulos, A. and M. Altmeyer, *The hammer and the dance of cell cycle control*. *Trends in biochemical sciences*, 2021. **46**(4): p. 301-314.
462. Natarajan, S., et al., *HMGA2 inhibits apoptosis through interaction with ATR-CHK1 signaling complex in human cancer cells*. *Neoplasia*, 2013. **15**(3): p. 263-IN13.
463. Oo, Z.Y., et al., *Combined use of subclinical hydroxyurea and CHK1 inhibitor effectively controls melanoma and lung cancer progression, with reduced normal tissue toxicity compared to gemcitabine*. *Molecular oncology*, 2019. **13**(7): p. 1503-1518.
464. Alvino, G.M., et al., *Replication in hydroxyurea: it's a matter of time*. *Molecular and cellular biology*, 2007. **27**(18): p. 6396-6406.
465. Wagner, S.A., et al., *ATR inhibition rewires cellular signaling networks induced by replication stress*. *Proteomics*, 2016. **16**(3): p. 402-416.
466. Ho, C.C., et al., *Stalled replication induces p53 accumulation through distinct mechanisms from DNA damage checkpoint pathways*. *Cancer research*, 2006. **66**(4): p. 2233-2241.
467. Viniegra, J.G., et al., *Full activation of PKB/Akt in response to insulin or ionizing radiation is mediated through ATM*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(6): p. 4029-4036.
468. Golding, S.E., et al., *Extracellular signal-related kinase positively regulates ataxia telangiectasia mutated, homologous recombination repair, and the DNA damage response*. *Cancer research*, 2007. **67**(3): p. 1046-1053.
469. Perkhofer, L., et al., *ATM deficiency generating genomic instability sensitizes pancreatic ductal adenocarcinoma cells to therapy-induced DNA damage*. *Cancer research*, 2017. **77**(20): p. 5576-5590.
470. Chabes, A. and L. Thelander, *Controlled protein degradation regulates ribonucleotide reductase activity in proliferating mammalian cells during the normal cell cycle and in response to DNA damage and replication blocks*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(23): p. 17747-17753.
471. Zuo, Z., et al., *Ribonucleotide reductase M2 (RRM2): Regulation, function and targeting strategy in human cancer*. *Genes & Diseases*, 2022.
472. Lopez, G., et al., *Mocetinostat combined with gemcitabine for the treatment of leiomyosarcoma: Preclinical correlates*. *PLoS One*, 2017. **12**(11): p. e0188859.

473. Yang, P.-M., L.-S. Lin, and T.-P. Liu, *Sorafenib inhibits ribonucleotide reductase regulatory subunit M2 (RRM2) in hepatocellular carcinoma cells*. *Biomolecules*, 2020. **10**(1): p. 117.
474. Liu, T.-P., Y.-H. Hong, and P.-M. Yang, *In silico and in vitro identification of inhibitory activities of sorafenib on histone deacetylases in hepatocellular carcinoma cells*. *Oncotarget*, 2017. **8**(49): p. 86168.
475. Nikolova, T., N. Kiweler, and O.H. Krämer, *Interstrand crosslink repair as a target for HDAC inhibition*. *Trends in pharmacological sciences*, 2017. **38**(9): p. 822-836.
476. Lai, T.-H., et al., *HDAC inhibition induces microRNA-182, which targets RAD51 and impairs HR repair to sensitize cells to sapacitabine in acute myelogenous leukemia*. *Clinical cancer research*, 2016. **22**(14): p. 3537-3549.
477. Stenvang, J., et al., *Biomarker-guided repurposing of chemotherapeutic drugs for cancer therapy: a novel strategy in drug development*. *Frontiers in Oncology*, 2013. **3**: p. 313.
478. Hu, H.-f., et al., *Mutations in key driver genes of pancreatic cancer: Molecularly targeted therapies and other clinical implications*. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2021. **42**(11): p. 1725-1741.
479. Zhang, X., et al., *RAD51 is a potential marker for prognosis and regulates cell proliferation in pancreatic cancer*. *Cancer cell international*, 2019. **19**(1): p. 1-11.
480. Liao, C., et al., *RAD51 Is Implicated in DNA Damage, Chemoresistance and Immune Dysregulation in Solid Tumors*. *Cancers*, 2022. **14**(22): p. 5697.
481. Orhan, E., et al., *Regulation of RAD51 at the transcriptional and functional levels: what prospects for cancer therapy?* *Cancers*, 2021. **13**(12): p. 2930.
482. Campani, D., et al., *Bcl-2 expression in pancreas development and pancreatic cancer progression*. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 2001. **194**(4): p. 444-450.
483. Abulwerdi, F., et al., *A novel small-molecule inhibitor of mcl-1 blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo*. *Molecular cancer therapeutics*, 2014. **13**(3): p. 565-575.
484. Goswami, S., et al., *PP2A is a therapeutically targetable driver of cell fate decisions via a c-Myc/p21 axis in human and murine acute myeloid leukemia*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2022. **139**(9): p. 1340-1358.
485. Cristóbal, I., et al., *PP2A inhibition is a common event in colorectal cancer and its restoration using FTY720 shows promising therapeutic potential*. *Molecular cancer therapeutics*, 2014. **13**(4): p. 938-947.
486. Smith, A.M., et al., *Activation of protein phosphatase 2A in FLT3+ acute myeloid leukemia cells enhances the cytotoxicity of FLT3 tyrosine kinase inhibitors*. *Oncotarget*, 2016. **7**(30): p. 47465.
487. Vidyasagar, A., N.A. Wilson, and A. Djamali, *Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target*. *Fibrogenesis & tissue repair*, 2012. **5**: p. 1-7.
488. Backe, S.J., et al., *Post-translational modifications of Hsp90 and translating the chaperone code*. *Journal of Biological Chemistry*, 2020. **295**(32): p. 11099-11117.
489. Masser, A.E., M. Ciccarelli, and C. Andréasson, *Hsf1 on a leash—controlling the heat shock response by chaperone titration*. *Experimental Cell Research*, 2020. **396**(1): p. 112246.

490. Yun, C.W., et al., *Heat shock proteins: agents of cancer development and therapeutic targets in anti-cancer therapy*. Cells, 2019. **9**(1): p. 60.
491. Dias, M.H., et al., *PP2A inhibition instructs spliceosome phosphorylation to create splicing vulnerability in colon adenocarcinoma*. bioRxiv, 2023: p. 2023.07. 12.548685.
492. Silver, J.T. and E.G. Noble, *Regulation of survival gene hsp70*. Cell Stress and Chaperones, 2012. **17**: p. 1-9.
493. Genovese, G., et al., *Synthetic vulnerabilities of mesenchymal subpopulations in pancreatic cancer*. Nature, 2017. **542**(7641): p. 362-366.
494. Byun, Y., et al., *Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis*. Cell Death & Differentiation, 2001. **8**(5): p. 443-450.
495. Ji, C.H., et al., *The AUTOTAC chemical biology platform for targeted protein degradation via the autophagy-lysosome system*. Nature communications, 2022. **13**(1): p. 904.
496. Young, Z.T., et al., *Stabilizing the Hsp70-Tau complex promotes turnover in models of tauopathy*. Cell chemical biology, 2016. **23**(8): p. 992-1001.
497. Hill, S.E., et al., *Benzothiazole Substitution Analogs of Rhodacyanine Hsp70 Inhibitors Modulate Tau Accumulation*. ACS Chemical Biology, 2023. **18**(5): p. 1124-1135.
498. Martin, T.G., et al., *Pharmacological inhibition of BAG3-HSP70 with the proposed cancer therapeutic JG-98 is toxic for cardiomyocytes*. Journal of cellular biochemistry, 2022. **123**(1): p. 128-141.
499. Kuzuoglu-Ozturk, D., et al., *N-myc-Mediated Translation Control Is a Therapeutic Vulnerability in Medulloblastoma*. Cancer Research, 2023. **83**(1): p. 130-140.
500. Lu, J., et al., *Inhibition of serine/threonine phosphatase PP2A enhances cancer chemotherapy by blocking DNA damage induced defense mechanisms*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(28): p. 11697-11702.
501. Mazhar, S., et al., *Targeting PP2A in cancer: Combination therapies*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2019. **1866**(1): p. 51-63.
502. Lee, S.-Y., C. Jang, and K.-A. Lee, *Polo-like kinases (plks), a key regulator of cell cycle and new potential target for cancer therapy*. Development & reproduction, 2014. **18**(1): p. 65.
503. Liu, X. and R.L. Erikson, *Polo-like kinase (Plk) 1 depletion induces apoptosis in cancer cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(10): p. 5789-5794.
504. Driscoll, D.L., et al., *Plk1 inhibition causes post-mitotic DNA damage and senescence in a range of human tumor cell lines*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e111060.
505. Su, S., et al., *PLK1 inhibition-based combination therapies for cancer management*. Translational Oncology, 2022. **16**: p. 101332.
506. Liang, K., et al., *Combined Inhibition of UBE2C and PLK1 Reduce Cell Proliferation and Arrest Cell Cycle by Affecting ACLY in Pan-Cancer*. International Journal of Molecular Sciences, 2023. **24**(21): p. 15658.
507. Zvereff, V., et al., *Colocalisation of CD9 and mortalin in CD9-induced mitotic catastrophe in human prostate cancer cells*. British journal of cancer, 2007. **97**(7): p. 941-948.
508. Wang, V.M.-Y., et al., *CD9 identifies pancreatic cancer stem cells and modulates glutamine metabolism to fuel tumour growth*. Nature cell biology, 2019. **21**(11): p. 1425-1435.

509. Podergajs, N., et al., *Transmembrane protein CD9 is glioblastoma biomarker, relevant for maintenance of glioblastoma stem cells*. *Oncotarget*, 2016. **7**(1): p. 593.
510. Touzet, L., et al., *CD9 in acute myeloid leukemia: Prognostic role and usefulness to target leukemic stem cells*. *Cancer medicine*, 2019. **8**(3): p. 1279-1288.
511. Liu, Y., et al., *CD9, a potential leukemia stem cell marker, regulates drug resistance and leukemia development in acute myeloid leukemia*. *Stem cell research & therapy*, 2021. **12**: p. 1-13.
512. Leung, K.T., et al., *The tetraspanin CD9 regulates migration, adhesion, and homing of human cord blood CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2011. **117**(6): p. 1840-1850.
513. Arriazu, E., R. Pippa, and M.D. Odero, *Protein phosphatase 2A as a therapeutic target in acute myeloid leukemia*. *Frontiers in oncology*, 2016. **6**: p. 78.

A. Publikationen

- 12/2023 The protein phosphatase-2A subunit PR130 is linked to cytotoxic protein aggregate formation in mesenchymal pancreatic ductal adenocarcinoma cells. Available on bioRxiv. DOI: 10.1101/2023.09.03.556106; now under revision at ***Cell Communication and Signaling***
- 05/2022 The epigenetic modifier HDAC2 and the checkpoint kinase ATM determine the responses of microsatellite instable colorectal cancer cells to 5-FU in ***Cell Biology and Toxicology***. DOI: 10.1007/s10565-022-09731-3
- 09/2021 Class 1 Histone Deacetylases and Ataxia-Telangiectasia Mutated Kinase Control the Survival of Murine Pancreatic Cancer Cells upon dNTP Depletion in ***Cells***, MDPI. DOI: 10.3390/cells10102520
- 04/2021 Oxaliplatin-Induced Senescence in Colorectal Cancer cells [...] in ***Cancers***, MDPI. DOI: 10.3390/cancers13092019

B. Lehre & Betreuung

Dr. Alessa K. Leydecker (Dezember 2020 – Juni 2021)

- ❖ Zahnmedizinischer Doktorand
- ❖ „PP2A als pharmakologisches Zielprotein in Pankreaskarzinomzellen“

Seher Aksu (Oktober – November 2022)

- ❖ BMC, Forschungsmodul
- ❖ „Pharmakologische Effekte von PD und MK-1775 in MIA PaCA-2 Zellen“

Lena Morschhäuser (Mai – Juni 2023)

- ❖ BMC, Forschungsmodul
- ❖ „Untersuchung einer synergistischen Wirkung von der Inhibitoren PD und MK-1775 in MV4-11- und RS4-11-Zellen“

Praktikum der Pharmakologie und Toxikologie für Naturwissenschaftler

- ❖ „posttranslationale Modifikationen“
- ❖ Betreuung und Diskussion

Biochemisches Grundpraktikum für BMC, Chemiker und Biologen

- ❖ „Nachweis von Lipiden und Bestimmung des Cholesteringehalts“
- ❖ Betreuung, Diskussion, Korrektur und Bewertung der Protokolle

Seminar: Molekulare und zelluläre Toxikologie für Naturwissenschaftler

- ❖ Vortrag und Diskussion

Progress Seminar: Molekulare und genetische Toxikologie

- ❖ „*Tumor-relevant functions and therapeutic relevance of the PP2A/PR130-complex in the pancreatic carcinoma*“
- ❖ Vortrag und Diskussion

C. Konferenzen

- 3rd Mini-Symposium in Translational Oncology (**MiTraC**), “Emerging Concepts in Immuno-Oncology & DNA Damage”, Mainz, 28.09.2021

D. Lebenslauf

Daten zur Person

Geburtsdatum/-ort 25.04.1993 in Darmstadt
Staatsangehörigkeit Deutschland
Adresse Am Fort Elisabeth 35
55131 Mainz
Kontakt phuc.nhien@hotmail.de
+49 176 64182463



Akademische Laufbahn

04/2020 – 10/2023

Universitätsmedizin der JGU, Mainz
PhD-Student am Institut für Toxikologie

- Forschungsthema: “*Tumor-relevant functions and therapeutic relevance of the PP2A/PR130-complex in the pancreatic carcinoma*”

04/2018 – 03/2020

Johannes Gutenberg Universität (JGU), Mainz
Biomedizinische Chemie, M.Sc.

- Abschluss: **Master of Science**
- Masterarbeit: “Untersuchungen zur Zytostatika-induzierten Seneszenz in Kolorektal- und Glioblastomzellen“

04/2014 – 04/2018

Johannes Gutenberg Universität (JGU), Mainz
Biomedizinische Chemie, B.Sc.

- Abschluss: **Bachelor of Science**
- Bachelorthesis: “Ultraschallvokalisation bei jungen und adulten Mäusen mit dem Schwerpunkt auf die Vokalisation der männlichen 5xFAD Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen“

10/2012 – 03/2014

**Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt
a.M., Biowissenschaften**

2003 – 2012

Eleonoren Gymnasium, Darmstadt

- Abschluss: Abitur
- Prüfungsfächer: Chemie, Geschichte,
Mathematik, Deutsch, Biologie

Praktika

10/2018 – 12/2018

**Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie,
JGU Mainz**

- Forschungsaufgabe: “Biotransformation von
Terpenen in Schimmelpilzen”

01/2019 – 02/2019

**Institut für Pharmazeutische und Biomedizinische
Wissenschaften, JGU Mainz**

- Forschungsaufgabe:
“X10-Expansionsmikroskopie”

