

**P53-abhängige Sensitivität von Chemotherapie und
ionisierender Strahlung in kolorektalen
Karzinomzellmodellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Milazzo, Alfio

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Schittenhelm
2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Zips

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	IV
Formelverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung.....	1
1.1 Ätiologie und Risikofaktoren.....	3
1.2 Die Karzinogenese.....	4
Das Hanahan-Weinberg-Modell	4
Das Vogelstein-Modell	6
Das Jass-Modell.....	7
1.3 Der Tumorsuppressor p53	8
Die p53 Domänen	9
Die N-terminale Domäne	9
Die Prolinreiche Domäne.....	10
DNA-Bindungsdomäne	10
Die C-Terminale Domäne	10
Funktionen des p53.....	11
p53 als Transkriptionsfaktor.....	11
p53 als Transaktivator	11
p53 als Repressor	11
Die Regulation des p53.....	12
Autoregulation über Mdm2	12
Mdm2-unabhängiger Regelkreis.....	12
Regulation über Extended Family Siblings	13
Genotoxischer Stress	13
Hypoxie und Energiemangel.....	13
Aktivierung durch Proto-Onkogene.....	14
1.4 Die p53-vermittelten zellulären Funktionen	14
Apoptose.....	14
Transkriptionsunabhängige Apoptose durch p53	15

1.5	Therapie	16
	5-Fluoruracil	16
	Oxaliplatin	17
	Irinotecan	18
	Die Strahlentherapie	19
	Die biophysikalischen Eigenschaften ionisierender Strahlung.....	19
	Das Grundprinzip eines Linearbeschleunigers	21
1.6	Die Apoptose	22
	Der extrinsische Signalweg	23
	Der intrinsische Signalweg	24
	Regulation der Apoptose.....	25
	Die BCL-2 Proteinfamilie	26
1.7	Die Nekrose	28
1.8	Mitose und Zellzyklus.....	28
	G ₁ /S Übergang	30
	G ₂ /M Übergang.....	30
	Zellzyklussteuerung durch p53	30
1.9	Der MAPK-Signalweg	31
1.10	Fragestellung	32
2.	Material und Methoden.....	33
2.1	Material	33
	Zelllinien.....	33
	Nährmedien.....	33
	Laborgeräte.....	34
	Chemikalien	35
	Antikörper.....	37
	Software	37
2.2	Methoden	38
	Die Kultivierung von Zelllinien	38
	Die Zellzahlbestimmung.....	38
	Die Kryokonservierung und das Auftauen eukaryontischer Zellen	39
	Die Bestimmung der Verdopplungszeiten	40

Die Behandlung der Zellen.....	41
Die chemotherapeutische Behandlung	41
Die Bestimmung des zytotoxischen Potentials einzelner Therapeutika .	41
Die Bestrahlung mit ionisierender Strahlung.....	42
Die Apoptose Assays.....	43
Die Zellzyklusanalysen (Nicoletti-Färbung).....	44
Die Viabilitäts- und Zytotoxizitäts-Assays	45
Proteinexpression	46
Die Herstellung der Lysate	46
Die Proteinquantifizierung nach Bradford	47
Proteinauftrennung	48
Western Blot	49
2.3 Statistik	51
3. Ergebnisse	52
3.1 Charakterisierung der Zelllinien	52
Mikroskopie	52
Verdopplungszeit	54
3.2 Sensitivitätsassays	54
Ermittlung der einzusetzenden Zellzahlen.....	54
Durchflusszytometrische Messung des Zellüberlebens.....	55
Chemotherapeutika	55
Berechnung der ED ₅₀ Werte	59
Bestrahlung	60
Kombination aus Chemotherapeutika und ionisierender Strahlung	61
3.3 Proliferationsassay	65
3.4 Zellzyklusanalysen	69
3.5 Analysen der Proteinexpression	76
3.6 Die DLD-1 Zelllinie	78
Kombinationsversuche mit ionisierender Strahlung	78
Zellzyklusanalysen	80
4. Diskussion	84
4.1 Charakterisierung der Zelllinien	85

4.2	Zytotoxische Wirkung der Einzelbehandlungen	86
	5-Fluoruracil	86
	5-Fluoruracil führt zu einem G ₁ -Phasen-Arrest in DLD-1 Zellen	88
	Irinotecan	89
	Irinotecan führt zu einem G ₂ Arrest	90
	Oxaliplatin	91
	Ionisierende Strahlung	92
	Ionisierende Strahlung löst einen G ₁ -Phasen-Arrest in p53 +/+ Zellen aus	92
	Die Viabilitäts- und Zytotoxizitäts-Assays	93
4.3	Die Radio- Chemokombinationbehandlung	94
	Die p53 -/- Zellen profitieren von der Kombinationsbehandlung	94
	Die p53 +/+ Zellen und die Kombinationen	95
	Die Kombination führt zu einer Überleitung in die G ₂ -Phase	96
4.4	Ausblick	97
5.	Zusammenfassung	99
6.	Literaturverzeichnis	101
7.	Selbständigkeitserklärung	116
8.	Danksagung	117
	Curriculum vitae	118

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2012 (nicht-melanotischen Hautkrebs ausgenommen).	1
Abbildung 2: Hallmarks of Cancer von Hanahan und Weinberg Hallmarks of Cancer von Hanahan und Weinberg aus dem Jahre 2000.....	4
Abbildung 3: Hallmarks of Cancer von Hanahan und Weinberg aus dem Jahre 2011.	5
Abbildung 4: Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelstein.	6
Abbildung 5: Die Schematische Darstellung der kolorektalen Karzinogenese nach Jass.	8
Abbildung 6: Die Systematik der p53 Domänen.	9
Abbildung 7: 5-Fluoruracil und die physiologischen Basen Uracil und Thymin [98].	16
Abbildung 8: Schematische Darstellung der 5-Fu Angriffspunkte.....	17
Abbildung 9: Die Strukturformel des Oxaliplatin.	17
Abbildung 10: Die Strukturformel des Irinotecans.	18
Abbildung 11: Der extrinsische Signalweg der Apoptose.	24
Abbildung 12: Schematische Darstellung des intrinsischen Signalweges der Apoptose.	25
Abbildung 13: Phasenkontrastaufnahmen der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien.....	53
Abbildung 14: Überblickdarstellung avitaler Zellen in Relation zur unbehandelten Kontrollgruppe unter Behandlung mit 5-Fu.	56
Abbildung 15: Überblickdarstellung avitaler Zellen in Relation zur unbehandelten Kontrollgruppe unter Behandlung mit CPT-11.....	57
Abbildung 16: Überblickdarstellung avitaler Zellen in Relation zur unbehandelten Kontrollgruppe unter Behandlung mit Oxaliplatin.....	58
Abbildung 17: Überblickdarstellung avitaler Zellen nach Bestrahlung.	60
Abbildung 18: Relativer Anteil avitaler Zellen in der Kombinationsbehandlung 5-Fu und 5 Gy.	62

Abbildung 19: Relativer Anteil avitaler Zellen unter der Kombinationsbehandlung CPT-11 und 5 Gy.....	63
Abbildung 20: Relativer Anteil avitaler Zellen unter der Kombinationsbehandlung mit Oxaliplatin.	64
Abbildung 21: Darstellung der HTC116 Zellviabilität.	66
Abbildung 22: Darstellung der RKO Zellviabilität.....	67
Abbildung 23: Darstellung der Zellzyklusanalysen der HCT116 Zellen.	69
Abbildung 24: Darstellung der Zellzyklusanalysen der RKO Zellen.....	71
Abbildung 25: Darstellung der Zellzyklusanalysen der HCT116 Zellen.	72
Abbildung 26: Darstellung der Zellzyklusanalysen der RKO Zellen.....	73
Abbildung 27: Darstellung der Zellzyklusanalysen der HCT116 Zellen.	74
Abbildung 28: Darstellung der Zellzyklusanalysen der RKO Zellen.....	75
Abbildung 29: Western Blot-Analysen.	76
Abbildung 30: Western Blot-Analysen.	77
Abbildung 31: Relativer Anteil avitaler Zellen unter der Kombinationsbehandlung.....	78
Abbildung 32: Darstellung der Zellzyklusanalysen der DLD-1 Zellen.....	80
Abbildung 33: Darstellung der Zellzyklusanalysen der DLD-1 Zellen.....	81
Abbildung 34: Darstellung der Zellzyklusanalysen der DLD-1 Zellen.....	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die Mitglieder der BCL-2 Familie und deren Funktion auf die Apoptose.....	26
Tabelle 2: Zelllinien und verwendetes Nährmedium.....	33
Tabelle 3: Nährmedienzusätze.....	33
Tabelle 4: Verwendete Konzentrationen.....	41
Tabelle 5: Verwendete Konzentrationen für die Kombinationsversuche mit 5 Gy Bestrahlungsdosis und einer Inkubationszeit von 48 und 72 Stunden.....	42
Tabelle 6: Verwendete Fluorochrome mit entsprechenden Emissionswerte....	43
Tabelle 7: Verwendete Konzentrationen für die Zellzyklusanalysen.....	45
Tabelle 8: Zusammensetzung des verwendeten Lysepuffers.....	47
Tabelle 9: Zusammensetzung der Denaturierungslösung.....	48
Tabelle 10: Zusammensetzung des Laufpuffers.....	49
Tabelle 11: Zusammensetzung des Transferpuffers.....	50
Tabelle 12: Zusammensetzung des Waschpuffers.....	50
Tabelle 13: Verwendete Antikörper.....	50
Tabelle 14: Berechnete Verdopplungszeiten der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien.....	54
Tabelle 15: Übersicht der eingesetzten Zellzahl für die entsprechende Zelllinie, Plattengröße und Mediumvolumen, die nach 72 h zu einer 80 %igen Konfluenz führten.....	55
Tabelle 16: Berechnete ED ₅₀ Werte sowie die Regressionskoeffizienten.....	59
Tabelle 17: Charakterisierung der Zellen.....	85
Tabelle 18: Molekulare Charakterisierung der Zellen.....	86
Tabelle 19: Prozentuale Veränderung der Anteile avitaler Zellen während der Kombinationsbehandlungen im Vergleich zu der chemotherapeutischen Einzelbehandlung.....	94

Formelverzeichnis

Formel 1: Definition der Strahlendosis.	20
Formel 2: Bestimmung der Zellzahl je ml Suspension.....	39
Formel 3: Berechnung der Wachstumskonstante μ	40
Formel 4: Berechnung der Verdopplungszeiten t_d	40
Formel 5: Integrierte Formel zur Berechnung der Verdopplungszeiten t_d	40
Formel 6: Berechnung der spezifischen Absorption von XTT.....	46
Formel 7: Das Lambert-Beer'scheGesetz.	48
Formel 8: Berechnung der Proteinkonzentration einer Probe.....	48

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
μ	Mikro
5-Fu	5-Fluoruracil
5-FUDP	5-Fluorouridindiphosphat
5-FUMP	5-Fluorouridinmonophosphat
5-FUTP	5-Fluorouridintriphosphat
Ak	Antikörper
AKT	<i>v-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
APC	<i>Adenomatous-polyposis-coli-Protein</i>
APO-1	apoptosis antigen 1
ARF	<i>Alternate reading frame</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
Bad	<i>Bcl-2-Antagonist of Cell Death</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous killer</i>
Bax	Bcl-2-assoziirtes-X Protein
Bcl-2	<i>B-Cell Lymphoma 2</i>
Bcl- χ L	<i>B-Cell Lymphoma-extra large</i>
BH3	<i>Bcl-2 homology domain 3</i>
Bid	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
B-Raf	<i>v-Raf Murine Sarkoma Viral Oncogene Homolog B1</i>
CAK	CDK-aktivierende-Kinase
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDK	Zyclin-abhängigen-Proteinkinasen
Ch	Chromosom
CIMP	CpG-Insel Methylierungsphänotyp

CKI	CDK-Inhibitoren
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Dinukleotiden
CPT-11	Irinotecan
CYP	Cytochrom P450
CYC	Cytochrom C
DISC	<i>Death inducing signaling complex</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E2F	Eukaryotischer Transkription Faktor
ED ₅₀	Mittlere Effektivdosis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ERK	<i>Extracellular-Regulated-Signal Kinase</i>
FACS®	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
FAP	<i>Familiäre adenomatöse Polyposis</i>
FBS	Fötales Kälberserum
FCS	<i>Forward light scatter</i>
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FL	Fluoreszenz
FLIPs	<i>FADD-like-Interleukin-1 β-converting-enzyme-proteasen</i>
FOLFIRI	Therapieschema aus Folinsäure, 5-Fu und CPT-11
FOLFOX	Therapieschema aus Folinsäure, 5-Fu und Oxaliplatin
Gadd45	<i>Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45 Protein</i>
GSK-3β	Glykogensynthase-Kinase 3
Gy	Gray
h	Stunde(n)
HDACs	Histon-Deacetylasen
HNPCC	<i>Hereditäres nichtpolypöse kolorektales Karzinom</i>

IAPs	<i>Inhibitor of apoptosis</i>
Int-1	Integration 1
IR	Ionisierende Strahlung
IRS-1	Insulin-Rezeptor-substrat1
JNK	<i>Jun N-terminal Kinase</i>
kDa	Kilodalton
KRK	Kolorektaleskarzinom
MAPK	Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinasen
Mcl1	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein1</i>
Mdm2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MeV	Megaelektronenvolt
MGMT	Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mol	Mol
mRNA	Messenger RNA
MSI	Mikrosatelliten-Instabilität
NF-κB	<i>Nuclear-Factor-κB</i>
nm	Nanometer
Noxa	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
OPRT	<i>Orotat-Phosphoribosyltransferase</i>
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PRPP	Co-Faktor 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat
PTEN	Phosphatase mit Tensin Homologie
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
K-RAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene homolog</i>
Rb	Retinoblastoma Protein
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure

ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis</i>
SN-38	Aktives Metabolit des CPT-11
SPRY2	<i>Sprouty homolog 2</i>
SSC	<i>Sideward light scatter</i>
TFIID	Transkriptionsfaktor IID
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein
TS	Thymidylatsynthetase
u.a.	Und andere; unter anderem
UICC	Union internationale contre le cancer
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolette Strahlung
WG	<i>Wingless</i>
Wnt1	<i>Wingless-Int-1Homolog</i>
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid
z. B.	Zum Beispiel
γ	Gamma
κ	Kappa
λ	Lamda
Δ	Delta
Ψ	Psi

1. Einleitung

Im Jahr 2015 referierten das Robert-Koch-Institut (RKI) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. in einem gemeinsamen Bericht „Krebs in Deutschland 2011/2012“ über ca. 477.950 neue Krebserkrankungen in Deutschland [1]. Im selben Jahr waren Krebserkrankungen mit 228.289 Todesfällen nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in der Bevölkerung [2]. Werden diese Zahlen genauer betrachtet, lässt sich eine geschlechtsabhängige Inzidenzrate sowie Organmanifestation beobachten. So erkrankten Männer im Durchschnitt häufiger an Krebs als Frauen [1]. Die häufigsten Krebsarten waren bei Männern dabei Neoplasien der Prostata, gefolgt von Neoplasien der Lunge und des Darms. Bei Frauen hingegen waren dies Neoplasien der Brustdrüse, des Darmes und der Lunge.

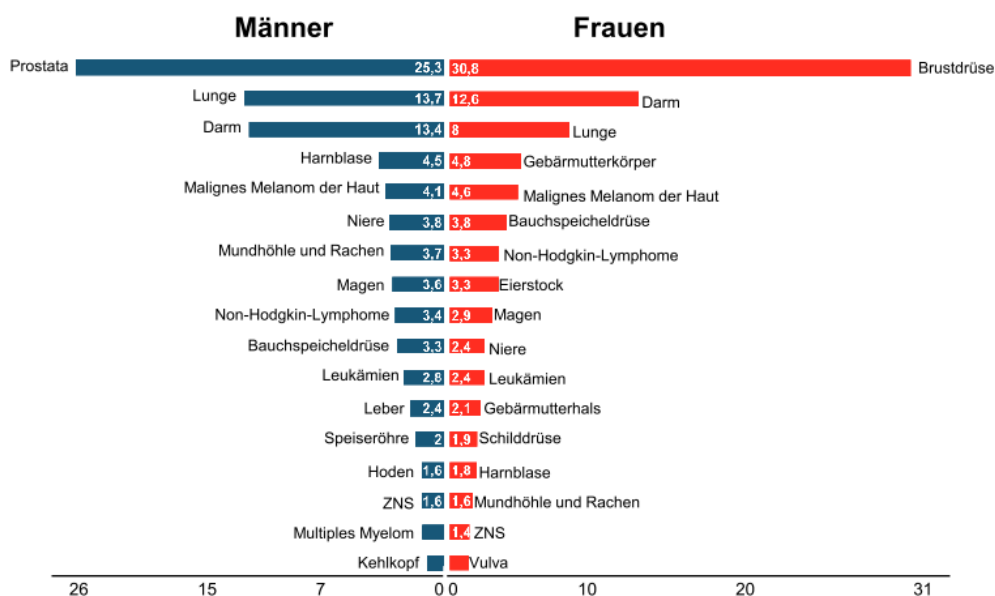


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2012 (nicht-melanotischen Hautkrebs ausgenommen).
Abbildung modifiziert nach Krebs in Deutschland...[1].

Folglich stellten Neoplasien des Darmes insgesamt die zweithäufigste Krebserkrankung 2012 dar. Dies belegen auch Zahlen des RKI: So wurden im Jahr 2012 insgesamt mehr als 62.200 Neuerkrankungen und circa 25.972 Todesfälle, die auf Darmkrebs zurückzuführen sind, registriert [1].

Bestimmt man die Determinanten für eine Remission bzw. Prognose, sind dabei der Zeitpunkt der Diagnosestellung und die anatomische Lokalisation des

Primärtumors von besonderer Bedeutung. Abhängig vom Stadium, in welchem der Krebs entdeckt wurde und der anatomischen Lokalisation des Tumors sind auch das Tumorwachstum, die Ausbreitung in umliegende Organe und Lymphknoten, sowie die Ausbildung von Fernmetastasen prognosebestimmend. Anhand dieser Faktoren lassen sich Kolorektalkarzinome (KRK) u.a. in Stadien der *Union internationale contre le cancer* (UICC-Stadien) einteilen. Das festgelegte UICC-Stadium des Tumors bestimmt dann die weitere Behandlung und spiegelt die 5-Jahres-Überlebensraten wider [3].

Das kumulative 5-Jahres-Überleben aller Kolonkarzinompatienten in Deutschland liegt zurzeit bei ca. 60 % [4, 5]. Die Therapie des KRK beruht dabei auf den klassischen drei Säulen der Tumorthherapie: Der Chirurgie, der Radio- und der Chemotherapie. Die chirurgische Abtragung von Polypen oder die Resektion des Tumors steht hier im Vordergrund. Die Radio- und/oder Polychemotherapie werden bei einer präoperativ-neoadjuvanten Therapie, einer adjuvanten Therapie (ab UICC-Stadium 3) oder bei einer palliativen Therapie angewendet [3].

Das Therapieansprechen auf eine Radio-/Chemotherapie ist beim KRK allerdings sehr variabel. Zuverlässige etablierte prädiktive Faktoren, die routinemäßig zur prognostischen Einschätzung des Therapieansprechens herangezogen werden, existieren nur bedingt. Mutationen im Tumorsuppressorgen TP53 werden in mindestens 50% aller Malignome beschrieben [6]. Im Besonderen wurde für mehrere Tumorentitäten u. a. bei der chronischen lymphatischen Leukämie gezeigt, dass das Vorliegen einer p53 Mutation mit schlechteren Therapieansprechen assoziiert ist [7].

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der Mutationstatus von p53 einen prognostischen Einfluss auf die Radio-/Chemotherapie des KRK hat. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurden mehrere isogene p53 wildtyp (+/+) vs. *knock-out* (-/-) Zellmodelle herangezogen (humane KRK-Zelllinien HCT116, RKO und DLD-1), um den Antitumoreffekt von Standardchemotherapeutika und/oder Radiotherapie mit Ionisierender Strahlung (IR) zu untersuchen.

Um die Interpretation der Daten zu erleichtern, werden einleitend hier zunächst die wichtigsten Modelle und Theorien der Karzinogenese, die Funktionen des Tumorsuppressors p53, die Wirkmechanismen der verwendeten Substanzen, sowie die gängigsten zellulären Signalwege vorgestellt.

1.1 Ätiologie und Risikofaktoren

Trotz enormer wissenschaftlicher Anstrengungen ist es bisher nicht gelungen, die genauen krebsauslösenden Faktoren der meisten Neoplasien zu benennen. Ausnahme hierbei sind einige Neoplasien, die durch Viren hervorgerufen werden. Für die meisten Neoplasien gibt es zumindest vielfältige Risikofaktoren. So können Noxen wie Teerstoffe in Zigarettenrauch zu intraepithelialen Neoplasien der Bronchialschleimhaut führen, andere bekannte Noxen sind beispielsweise Benzol für leukämische Erkrankungen, und vor allem UV-B-Strahlen für intraepithelialen Neoplasien der Haut [8-10].

Auch für die Entstehung des KRK sind einige Risikofaktoren bekannt. Diese sind u. a. das zunehmende Alter, Ernährungsgewohnheiten wie ballaststoffarme Kost, der Abusus von Genussmitteln wie Alkohol und Nikotin [11]. Ebenso spielen auch andere Erkrankungen eine wesentliche Rolle: Die chronisch entzündlichen Darmerkrankung *Colitis ulcerosa*, Infektionserkrankungen wie die *Schistosomiasis* und andere Tumorerkrankungen wie Brust-, Ovar- und Uteruskarzinome können zur Bildung intraepithelialer Neoplasien des Darmes beitragen [12]. Des Weiteren stehen Infektionen durch humane Papillomaviren (HPV) im Zusammenhang mit KRKs [13]. Darüber hinaus wird eine familiäre Anhäufung (hereditäre KRK) beobachtet. Die bedeutsamsten Erscheinungsformen bei den hereditären KRK sind die „familiäre adenomatöse Polyposis“ (FAP) und das „hereditäre, nichtpolypöse kolorektale Karzinom“ (HNPCC). Patienten mit FAP entwickeln bereits in jungen Jahren hunderte Polypen in Kolon und Rektum. Dies beruht in 80 % der Fälle auf einer APC-Mutation (*Adenomatous-polyposis-coli-Protein*) und zählt zu den obligaten Präkanzerosen [14]. Das HNPCC wird, ebenso wie die FAP, autosomal-dominant vererbt, jedoch liegen hierbei Defekte im Mismatch-Repair-System vor [15].

1.2 Die Karzinogenese

Stark vereinfacht lässt sich die Karzinogenese des KRKs in drei Phasen einteilen: Die Initiationsphase, die Promotion und die Progressionsphase [16]. In der ersten Phase der Initiation, kommt es zur Ausbildung von intraepithelialen Neoplasien, wie zum Beispiel Adenomen. In der Promotionsphase entwickeln sich die Zellen meist nicht weiter und verbleiben als gutartige Tumore. Sie können jedoch in die dritte Phase, die Progressionsphase übergehen. Diese ist durch ein aggressives Wachstum der Neoplasien gekennzeichnet. Dabei können die Zellen durch bestimmte Mutationen, bzw. durch die Aktivierung bestimmter Gene, mesenchymale Eigenschaften erlangen, mit denen sie u.a. in anderen Geweben eindringen können. Diese Invasivität definiert u.a. die Malignität von Krebserkrankungen. Für die Karzinogenese existieren verschiedene Modelle, die folgend kurz erläutert werden.

Das Hanahan-Weinberg-Modell

Das bereits im Jahre 2000 vorgestellte Modell von Hanahan und Weinberg beschreibt schrittweise durch Mutationen erworbene Merkmale, welche eine gesunde Zelle von einer Krebszelle unterscheiden [17].

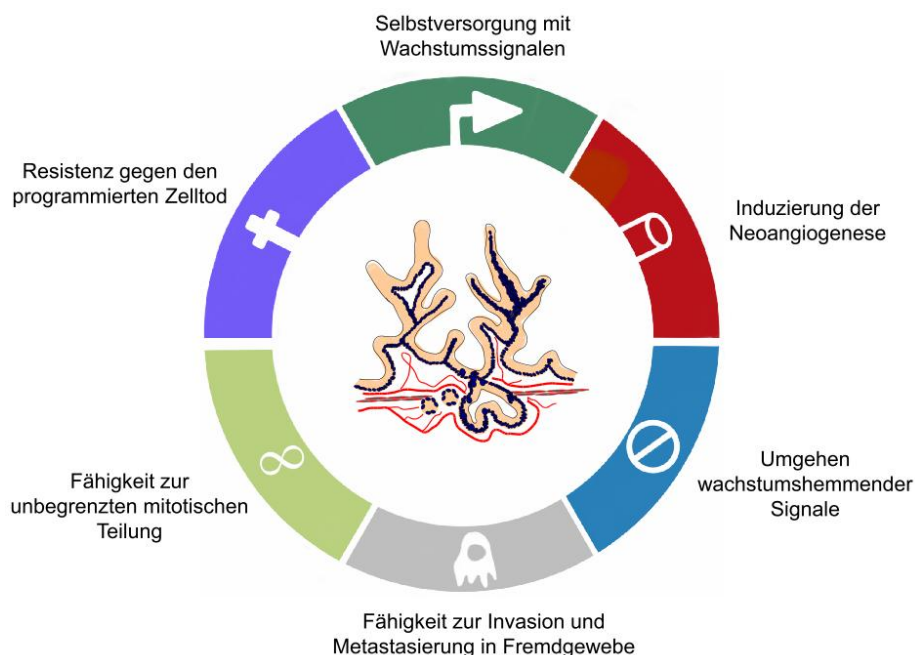


Abbildung 2: Hallmarks of Cancer von Hanahan und Weinberg Hallmarks of Cancer von Hanahan und Weinberg aus dem Jahre 2000.

Abbildung modifiziert nach Hanahan und Weinberg [17].

Merkmale von Krebszellen sind demnach:

- Selbstversorgung mit Wachstumssignalen
- Umgehen wachstumshemmender Signale
- Resistenz gegen den programmierten Zelltod
- Induzierung der Neoangiogenese
- Fähigkeit zur unbegrenzten mitotischen Teilung
- Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung in Fremdgewebe

Die dabei zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind nur teilweise geklärt. So schlagen Hanahan et al. mehrere zelluläre Signalwege vor, welche Ursache für die oben genannten Krebsmerkmale sein könnten [17]. In der Neuauflage des Modells von Hanahan und Weinberg aus dem Jahre 2011 wurden die Merkmale von Krebszellen um vier weitere Punkte ergänzt [18].

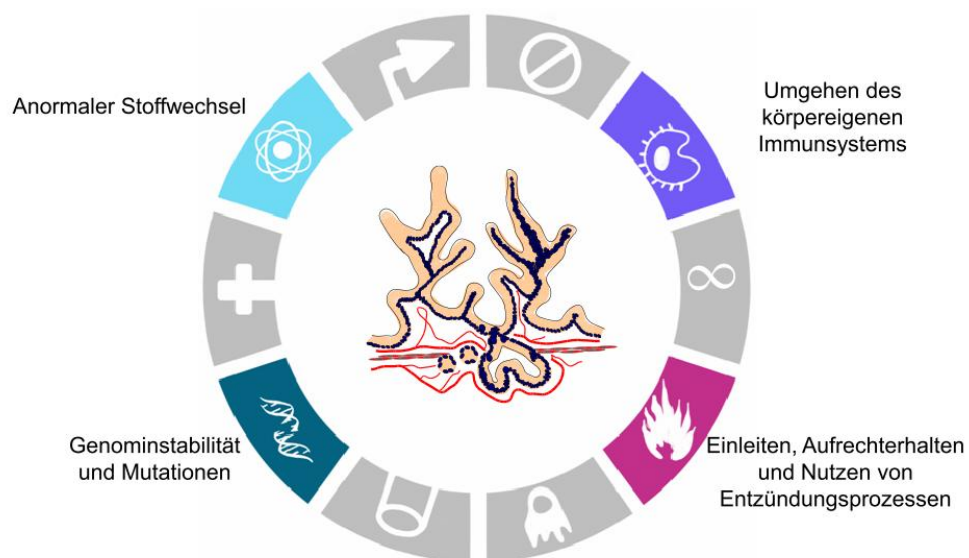


Abbildung 3: Hallmarks of Cancer von Hanahan und Weinberg aus dem Jahre 2011.
Abbildung modifiziert nach Hanahan und Weinberg [18].

Die Ergänzenden Merkmale von Krebszellen sind demnach:

- Umgehen des körpereigenen Immunsystems
- Anormaler Stoffwechsel
- Einleiten, Aufrechterhalten und Nutzen von Entzündungsprozessen
- Genominstabilität und Mutationen

Das Vogelstein-Modell

Ende der 1980er Jahre stellten Fearon und Vogelstein ein Modell der kolorektalen Karzinogenese vor [19-21]. Sie beschreiben die stufenweise Entwicklung von KRKs durch Akkumulation genetischer Mutationen in einer einzelnen Zelle. Diese Zelle, die sich aus den Stammzellen in den Krypten des Kolons durch Mutationen den körpereigenen Steuermechanismen entzogen hat, erfährt in der Regel eine bis zu 15 Jahre lange Entwicklung, bis letztendlich aus ihr ein KRK entsteht [21, 22]. Dabei durchläuft diese Zelle mehrere Stadien, die in der Adenom-Karzinom-Sequenz wiedergegeben werden können.

Durch den Verlust von körpereigenen Kontrollmechanismen und Mutationen entwickelt sich zunächst ein Adenom, welches sich über Zwischenstadien zu einem Tumor entwickelt. Die Akkumulation von Mutationen befähigt die Zellen zu einer verstärkten Proliferation, einer gestörten DNA-Reparatur, Umgehung der Seneszenzmechanismen, Apoptoseresistenz, Neovaskulogenese und der Fähigkeit zur Invasion und Migration.

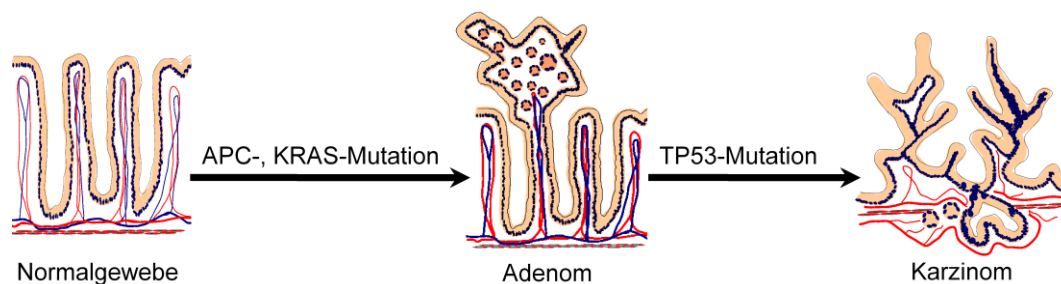


Abbildung 4: Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelstein.

Demnach basiert die Karzinogenese des KRK auf Mutationen, die etappenweise das gesunde Gewebe über noch gutartige Zwischenschritte sog. Adenome, zu einem bösartigen Karzinom verändern. Abbildung modifiziert nach Hirschi [23].

Das Modell von Fearon und Vogelstein erlaubt es auch, eine Aussage über die Prognose von KRKs zu treffen. Die im Rahmen der Krebsvorsorge bzw. akzidentiell in der Koloskopie abgetragenen Polypen sind nach diesem Modell frühe Stufen einer Krebserkrankung mit geringen malignen Kompetenzen. Die Abtragung führt für die Patienten zu einer Vollremission bzw. zu einer langfristigen Kontrolle der Erkrankung [24]. Symptomatische Patienten sind bereits in einem fortgeschrittenen Stadium mit entsprechend schlechterer Prognose.

Diese richtet sich in diesem Modell vor allem nach der Akkumulation weiterer Mutationen, welche die Invasion der Tumorzellen, die Migration sowie eine Chemoresistenz begünstigen [25].

Das Jass-Modell

Das von Jass et al. (2006) entwickelte Modell erlaubt die Klassifikation von KRKs aufgrund ihrer klinischen, histopathologischen und molekularen Eigenschaften [26, 27].

Die wichtigsten molekularen Marker sind die Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) und der CpG-Insel Methylierungsphänotyp (CIMP) [26, 27].

Eine MSI entsteht nach inaktivierenden Mutationen oder Methylierungen in Mismatch-Reparaturgenen. Daraus folgen Abweichungen in der Länge repetitiver Sequenzen während der DNA-Replikation [28]. Nach der Anzahl der Loci der Mutationen bzw. Methylierungen wird die MSI in nicht vorhanden (mikrosatellitenstabil), MSI-high oder MSI-low eingeteilt [29].

CpG-Inseln sind Abschnitte in eukaryotischen Promotorsequenzen, die einen überdurchschnittlichen Anteil an Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Dinukleotiden aufweisen [30-32]. Werden diese CpG-Inseln methyliert, so führt dies zum sogenannten „Gene Silencing“ [33]. Dies bedeutet, dass die betroffenen Gene nur noch schwach bis gar nicht exprimiert werden. Dies trifft besonders für das Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Reparaturgen (MGMT) zu [27]. Der CpG-Insel Methylierungsphänotyp wird in negativ, gering (CIMP-low) und hochgradig (CIMP-high) unterteilt [27]. Jass et al. zeigten, dass eine CIMP-low mit einer Initialen Mutation des K-Ras (*Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene homolog*) Onkogens und eine CIMP-high direkt an eine Initiale Mutation des B-Raf (*v-Raf Murine Sarkoma Viral Oncogene Homolog B1*) Onkogens gebunden ist [27]. Das vereinfachte Modell von Jass (siehe Abbildung 5) zeigt, dass KRK über adenomatöse Zwischenstufen entstehen. Diesen adenomatösen Veränderungen liegen bestimmte Mutationen zugrunde. So folgert Jass, dass das KRK als ein Sammelbegriff für bis zu fünf klinische, pathologische und molekulare Entitäten verstanden werden sollte, welche jeweils einer eigenen Behandlung bedürfen [27].

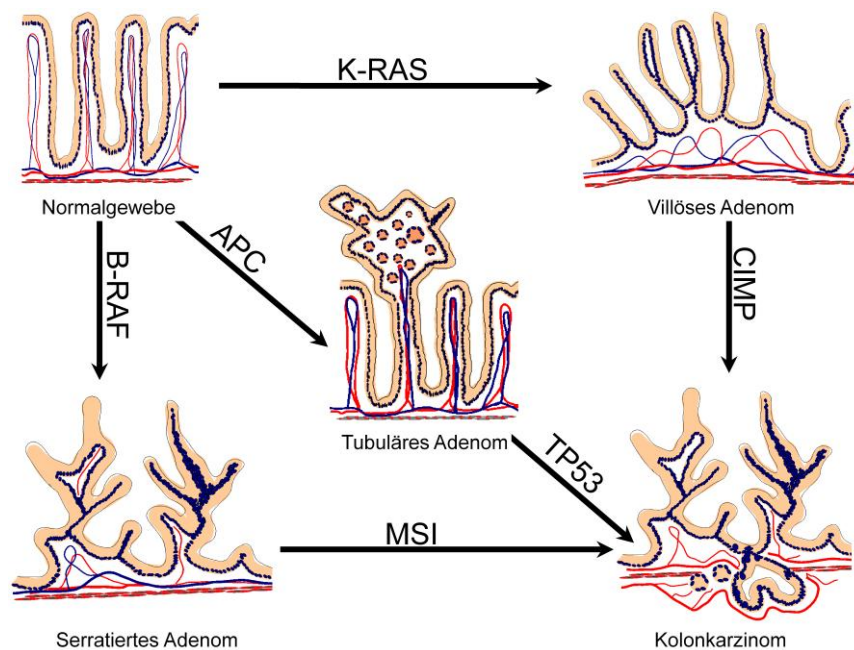


Abbildung 5: Die Schematische Darstellung der kolorektalen Karzinogenese nach Jass.

Ausgehend von gesundem Epithel entstehen durch verschiedene Mutationen, unterschiedliche Adenome. Diese können letztendlich zu einem Karzinom weiter mutieren. Somit sind diese Karzinome aus unterschiedlichen Vorstufen mit unterschiedlichen Mutationen entstanden. Somit liegen bei KRKs nach dem Modell von Jass, unterschiedliche Erkrankungen vor. Abbildung modifiziert nach Hirschi [23].

1.3 Der Tumorsuppressor p53

Das Protein p53 wurde erstmals 1979 in einer Arbeit von Lane und Crawford beschrieben [34]. Namensgebend für das Protein war dabei seine Molekülmasse von 53 kDa auf einer SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis*), wobei neuere Untersuchungen gezeigt haben, dass das Molekül 43,7 kDa groß ist [35]. Das Protein p53 gilt als erster dokumentierter Tumorsuppressor und spielt als Transkriptionsfaktor eine zentrale Rolle in der zellulären Antwort auf genotoxischen Stress. Es trägt den Beinamen „Wächter des Genoms“ [36, 37]. Das Gen, welches für p53 kodiert, ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 17(Ch17p13.1) lokalisiert und besitzt insgesamt 12 Exons [38, 39]. Der Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor p53 ist ein nukleäres Phosphoprotein. Es besteht aus insgesamt 393 Aminosäuren und weist strukturell fünf evolutionär stark konservierte Regionen auf, die als Domänen I bis V (siehe Abbildung 6) bezeichnet werden und in allen

Vertebraten vorkommen [40, 41]. Daraus ist zu folgern, dass diesen Domänen für die Funktion von p53 eine essentielle Rolle zuzuschreiben ist.

Die Domäne I liegt im N-terminalen Bereich, während die restlichen Domänen im zentralen Bereich kartiert sind.

Auch funktionell lässt sich das Protein in Domänen gliedern [41]: Die N-terminale Transaktivierungsdomäne von Aminosäure 1 bis 62, die Prolinreiche Domäne von Aminosäure 63 bis 94, die DNA-Bindungsdomäne von Aminosäure 94 bis 292 und die C-Terminale Region von Aminosäure 294 bis 393. Abbildung 6 (A) zeigt als Histogramm die Häufigkeiten der jeweils mutierten Aminosäuren im Protein p53 in KRKs [42].

Die p53 Domänen

Die N-terminale Domäne

Die Aminosäuren 1 bis 62 bilden den aminoterminalen Bereich in dem sich die Transaktivierungsdomäne befindet. Diese Domäne ist in der Lage spezifische Zielgene zu transaktivieren. Essentiell hierfür sind Leucin 22 und Tryptophan 23 [43]. Diese Aminosäuren binden an Untereinheiten des Transkriptionsfaktor-IID (TFIID) [44, 45]. Deletionen in diesem Bereich führen zu einem schwerwiegenden Funktionsverlust von p53, da hierdurch keine Zielgene transaktiviert werden können.

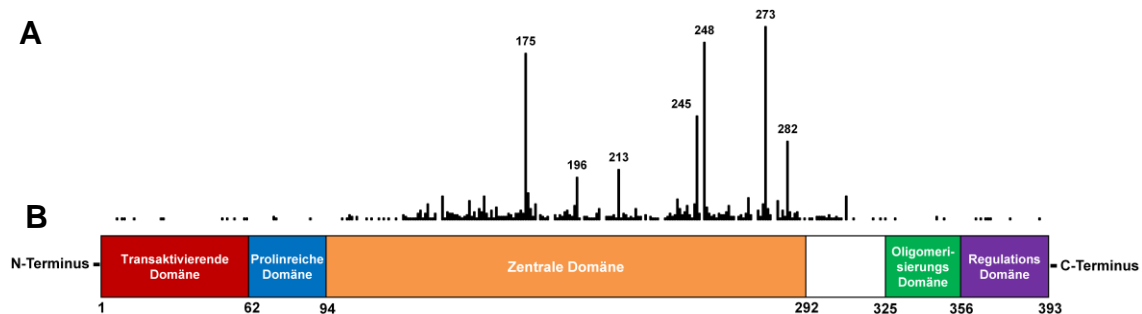


Abbildung 6: Die Systematik der p53 Domänen.

A zeigt das Histogramm der Mutationshäufigkeiten der jeweils betroffenen Aminosäuren in KRKs (Version R17, November 2013, www-p53.iarc.fr) [41]. **B** Schematische Darstellung des 393 Aminosäuren großen Proteins. Bis dato beinhaltet es 5 funktionellen Domänen. Über die transaktivierende Domäne (rot) kann p53 die Transaktivierung verschiedener Zielgene steuern. Die prolinreiche Domäne (blau) dient der Protein-Protein Interaktionen. Die „core“ oder Zentrale Domäne (gelb) interagiert mit der DNA. Die oligomerisierungs Domäne (grün) dient der Konformationsveränderung des p53. Die am C-Terminus befindliche Regulationsdomäne (violett) dient u.a. der negativen Auto-Regulation.

Dies führt im weiteren zu Ausfällen von Promotoren und letztendlich zur Induktion der Apoptose [46]. Des Weiteren können am N-Terminus andere Proteine wie beispielsweise das Onkoprotein Mdm2 binden, welches den nukleären Export triggert und so die Funktion von p53 beeinflusst [47, 48].

Die Prolinreiche Domäne

Die Prolinreiche Domäne befindet sich zwischen den Aminosäuren 63 bis 94. Für sie charakteristisch ist die Kumulierung von fünf PXXP-Wiederholungen, wobei P für Prolin und X für eine beliebige andere Aminosäure steht. Durch diese Sequenz bildet sich eine Bindungsstelle für SH₃-Domänen und ist somit essentiell für die Protein-Protein-Interaktion. So ist diese maßgeblich an der Induktion der Apoptose beteiligt [49, 50].

DNA-Bindungsdomäne

Die zentrale DNA-Bindungsdomäne ist von entscheidender Bedeutung für die Bindung von p53 an die DNA. Sie befindet sich zwischen den Aminosäuren 94 bis 292 und vermittelt die Bindung an p53-responsive Gene [51, 52]. Des Weiteren ist sie für die Protein-Protein-Interaktionen mit Bcl-2 und Bcl-xL verantwortlich, durch deren Bindung die Apoptose ausgelöst werden kann. Mutationen in diesem Bereich sind sehr häufig [53]. Die häufigste Mutation ist eine Punktmutation in den Aminosäuren R248 und R273, wodurch die Funktion von p53 als Transkriptionsfaktor verloren geht [53-55].

Die C-Terminale Domäne

Das carboxyterminale Ende wird von den Aminosäuren 294 bis 393 gebildet und vermittelt durch seine Tetramerisierungsdomäne die Oligomerisierung des Proteins. Diese Oligomerisierung ist für die Bindung des p53 an einzelsträngige DNA essentiell [56].

Darüber hinaus unterliegt der N- bzw. C-Terminus einer posttranslationalen Modifikation wie die Phosphorylierung bzw. Acetylierung. Wodurch die Aktivität von p53 weiter reguliert werden kann.

Funktionen des p53

p53 als Transkriptionsfaktor

Die Hauptfunktion von p53 ist die als Transkriptionsfaktor. Hierfür muss das Phosphoprotein-p53 im Zellkern lokalisiert sein. Es besitzt hier die Fähigkeit, DNA spezifisch und unspezifisch zu binden [57]. Dies geschieht im Zusammenspiel mit der zentralen DNA-Bindungsdomäne und dem C-Terminus. Durch eine Tetramisierung wird die kooperative Bindung an die DNA ermöglicht und die DNA-Bindungsdomäne kann an die entsprechenden Gene binden. Hierdurch wird die Expression der Gene, die eine p53-Erkennungsstelle besitzen, reguliert. Diese Regulierung findet statt, indem p53 im responsivem Element des Promotorbereich des jeweiligen Gens bindet und so die Transkriptionsfaktoren wie den TF IID rekrutiert und die Transkription aktiviert [43, 58].

p53 als Transaktivator

Eine weitere wichtige Funktion von p53 ist der Zellzyklusarrest durch die Transaktivierung von p21 [59]. Andere essentielle Funktionen sind die Einleitung der Apoptose durch die Transaktivierung von Bax, Puma und Noxa [60-62]. Des Weiteren werden durch p53 auch die Todesrezeptoren DR5, Fas und TNF transaktiviert, welche ebenfalls, wie bereits erwähnt, die Apoptose auslösen können [6, 63]. Schließlich kann p53 durch die Transaktivierung von u.a. Thrombospondin1 die Hemmung der Neoangiogenese auslösen [57].

p53 als Repressor

Der Transkriptionsfaktor p53 kann nicht nur zur Transaktivierung von Genen beitragen, sondern auch die Expression von Genen unterdrücken. Die Regulation dieser Gene, welche keine p53-Bindungsstelle aufweisen, wird vermutlich über die C-Terminale Region von p53 bewerkstelligt [57]. Für diese Repression sind weitere Co-Repressoren wie HDACs (Histon-Deacetylasen) notwendig [64].

Die Regulation des p53

Es ist klar zu erkennen, dass das Tumorsuppressorprotein p53 eines der Schlüsselproteine in der Zellsteuerung ist. So werden verschiedene wesentliche Funktionen der Zelle wie der Zellzyklus, die Mitose, die Apoptose und die Seneszenz durch p53 kontrolliert und gesteuert [6].

Der Tumorsuppressor p53 unterliegt selbst eigenen hochkomplexen Regelkreisen, welche seine essentielle Bedeutung für die Zellsteuerung unterstreicht [65]. Diese Regelkreise werden im Folgenden kurz zusammengefasst.

Die wichtigsten autoregulatorischen Kreise sind:

- Regulation über Mdm2
- Mdm2 unabhängige Regulation
- Extended Family Siblings

Autoregulation über Mdm2

Das Protein Mdm2 (*Mouse double minute 2 homolog*) ist der Hauptregulator und zeitgleich Transaktivationsprodukt von p53 [6].

Das Mdm2-Protein ist u.a. eine p53-E3-Ubiquitin-Ligase mit einer kurzen Halbwertszeit von 20 bis 30 Minuten [66, 67]. Als E3-Ligase initiiert diese den nukleären Export und die proteosomale Degradation von p53. Durch diesen Aktivitätsverlust von p53 als Transkriptionsfaktor für Mdm2 wird ihr Anteil vermindert und die p53-Konzentration kann steigen. So bildet Mdm2 mit p53 einen negativen Regelkreis [68]. Insofern führen Störungen in diesem Regelkreis zu schwerwiegenden Funktionsstörungen im Zellstoffwechsel.

Mdm2-unabhängiger Regelkreis

Als Transkriptionsfaktor besitzt p53 die Fähigkeit, an seinen eigenen Promotor zu binden und so die eigene Transkription als Autotranskriptor zu aktivieren [69]. Eine weitere Regulation erfolgt über „Slug“, welches in der Lage ist, Puma zu hemmen [70, 71].

Regulation über Extended Family Siblings

Zu der p53-Familie gehören weitere Mitglieder wie p63 und p73. Diese Proteine haben eine ähnliche DNA-Bindungsstelle wie p53 und transaktivieren oder unterdrücken hierdurch ähnliche Proteine [72, 73]. p63 und p73 haben, wie p53, auch eigene Regelkreise, die hier aufgrund ihrer Komplexität nicht weiter erwähnt werden. Jedoch muss auf die Spleißvarianten dieser Proteine kurz eingegangen werden. Diese haben, gleich ihren Normalvarianten, ebenfalls die selbe DNA-Bindungsstelle wie p53, sind jedoch am N-Terminus trunkiert, dadurch transkriptional inaktiv und führen so zu einer kompetitiven Hemmung der p53-Familie [69, 74]. Des Weiteren fungiert p73 als Transaktivator für p53, indem es an den Promotor von p53 bindet und so zu einer Steigerung der p53-mRNA führt [69].

Genotoxischer Stress

Genotoxischer Stress kann p53 auf verschiedene Weise aktivieren. Eine besondere Rolle spielen hierbei Kinasen, die mit Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) verwandt sind. Kommt es zu einem DNA-Schaden, können die zur PI3-Superfamilie gehörenden Mitglieder „*Ataxia telangiectasia mutated*“ (ATM) und „*Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*“ (ATR) aktiviert werden. Durch eine Autophosphorylierung wird direkt oder indirekt über Checkpoint-Kinasen die posttranslationale Aktivierung von p53 gesteuert [75-77]. Durch diese N-terminale Phosphorylierung von p53 wird zusätzlich die Regulierung durch Mdm2 gehemmt, da diese E3-Ligase nicht mehr an das Substrat binden kann. Dies führt zu einer Erhöhung des p53-Spiegels mit Aktivierung der p53-Signalwege [78-80].

Hypoxie und Energiemangel

Durch den zellulären Sauerstoffmangel kommt es in der Zelle u.a. zu einer Hochregulierung von p53, was antiproliferative Effekte hervorruft und die Apoptose einleitet [81].

Des Weiteren ist p53 an der mitochondrialen Atmungskette beteiligt, indem es den Kupfertransporter (SCO2) transaktiviert. Dieser Kupfertransporter dient u. a. der Bereitstellung der Cytochrom C-Oxidase [82].

Außerdem kann ein Glukosemangel mittels AMP-Kinasen p53 phosphorylieren. Dadurch kann die Zelle über einen Zellzyklusarrest ihren Stoffwechsel herunter regulieren und überleben [83].

Aktivierung durch Proto-Onkogene

Proto-Onkogene wie Ras, Myc und β -Catenin spielen bei der Regulation der Zellproliferation, im Zellwachstum, in der Zelldifferenzierung, in der Migration und für die Apoptose eine wesentliche Rolle. Der Ablauf dieser Regulierung wird aufgrund ihrer Komplexität nur anhand des Proto-Onkogens Ras näher erläutert. Das Proto-Onkogen Ras, welches erstmals in Sarkoma von Ratten identifiziert wurde, kann den nuklearen p53-Spiegel regulieren [84]. Zur Ras-Familie gehören die G-Proteine H-Ras, K-Ras und N-Ras. Diese G-Proteine sind Integrale der Plasmamembran und dienen der Weiterleitung extrazellulärer Signale zu intrazellulären MAP3K-Signalkaskaden [85].

So kann dieses G-Protein durch die Induktion des ARF-Tumorsupressor den p53-Spiegel erhöhen, indem ARF (*alternate reading frame protein*) an Mdm2 bindet und so die p53-Ubiquitinierung verhindert [84, 86].

1.4 Die p53-vermittelten zellulären Funktionen

Apoptose

Wie bereits beschrieben, moduliert der Transkriptionsfaktor p53 u.a. den apoptotischen Prozess durch Transaktivierung der proapoptotischen BCL-2 Mitglieder sowie der Fas-Transmembranrezeptoren. Des Weiteren sensibilisiert p53 die Zelle für die Apoptose, indem es die antiapoptotischen Proteine Bcl2 und Bcl-xL reprimiert. Darüber hinaus ist p53 in der Lage, die Apoptose transkriptionsunabhängig auszulösen [87].

Transkriptionsunabhängige Apoptose durch p53

Dieser Weg der Apoptose ist durch direkte Protein-Protein-Interaktion von p53 mit pro- und antiapoptotischen Mitgliedern der BCL-2 Familie charakterisiert und führt somit zur schnellen Einleitung der Apoptose [88].

Es konnte gezeigt werden, dass eine Stressinduktion durch Chemotherapeutika bzw. UV- und γ -Strahlen sowie Hypoxie und ROS-Onkogene zu einer, wenn auch nur geringen, mitochondrialen Akkumulation von p53 führt [89-92]. Der Mechanismus der Translokation von p53 aus dem Zellkern zu den Mitochondrien ist noch nicht vollständig geklärt. Der nukleare Export wird durch die Ubiquitinierung von p53 durch Mdm2 initiiert. Im Zytoplasma induzieren weitere Proteine wie Bad die Translokation von p53 in die Mitochondrien [93-96].

Durch diese Translokation in die Mitochondrien führt p53 über Interaktion mit weiteren Proteinen letztendlich zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran mit Cytochrom C Freisetzung, welches letztendlich die Caspase 3 aktiviert. Dies kann auf verschiedene Art und Weise geschehen [92]. P53 kann nach Stressinduktion direkt mit den antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl- χ L interagieren [97].

Hierdurch werden die proapoptotischen Proteine Bak und Bax aus ihren Komplexen mit Bcl-2 und Bcl- χ L gelöst, und permeabilisieren anschließend die äußere Mitochondrienmembran. Des Weiteren kann p53 Bak aus der Sequestrierung mit Mcl1 lösen und so eine CYC Freisetzung induzieren [98, 99].

Darüber hinaus kann p53 im Zytoplasma vorkommende Komplexe aus Bax und Bcl- χ L lösen, indem es Bcl- χ L bindet und so Bax freisetzt. Puma, das von p53 transaktiviert wird, kann des Weiteren den Komplex von p53 und Bcl- χ L lösen und p53 wieder freisetzen, wodurch Bax wieder aktiviert werden kann [70].

1.5 Therapie

5-Fluoruracil

Das Zytostatikum 5-Fluorouracil wurde von Heidelberger et al. 1957 entwickelt und gehört noch heute zu den am häufigsten verabreichten Zytostatika. Es zählt zur Gruppe der Pyrimidin-Antimetaboliten.

Durch eine Substitution des Wasserstoffatoms, bzw. der Methylgruppe an Position Fünf des Uracils bzw. des Thymins, bildet 5-Fluorouracil deren Analoga (siehe Abbildung 7) [100].

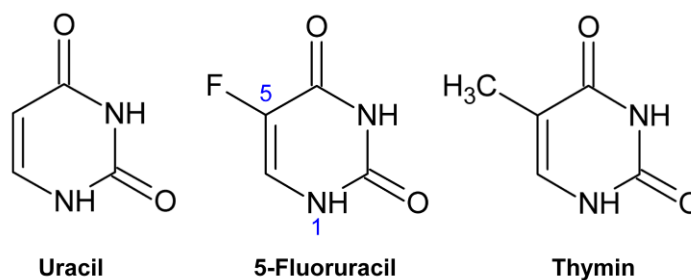


Abbildung 7: 5-Fluoruracil und die physiologischen Basen Uracil und Thymin [98].
5-Fu bildet ein Analogon für die Basen Uracil und Thymin.

5-Fluorouracil bedarf einer Bioaktivierung. Diese erfolgt intrazellulär auf zwei verschiedenen Wegen: Dem direkten und dem indirekten Weg. Der direkte Weg beinhaltet die Orotat-Phosphoribosyltransferase (OPRT) und 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (PRPP), die 5-Fluorouracil durch Übertragung eines Ribosephosphatrestes zu 5-Fluorouridinmonophosphat (5-FUMP) katalysieren [101].

Der indirekte Weg geht über die Bildung von 5-Fluorouridin durch die Uridin-Phosphorylase und anschließend über die Bildung von 5-FUMP durch die Uridin-Kinase [102]. 5-FUMP wird mittels Nukleotidkinasen über das Zwischenprodukt 5-Fluorouridindiphosphat (5-FUDM) zu 5-Fluorouridintriphosphat (5-FUTP) phosphoryliert.

Somit konkurriert 5-FUTP mit Uridintriphosphat um den Einbau in die RNA (siehe Abbildung 8), und beeinträchtigt somit die Proteinbiosynthese [103]. Des Weiteren kann FUDM mittels der Ribonukleotidreduktase zu Fluoro-Desoxyuridin-Monophosphat reduziert werden, welches die Thymidylatsynthetase (TS) hemmt [104].

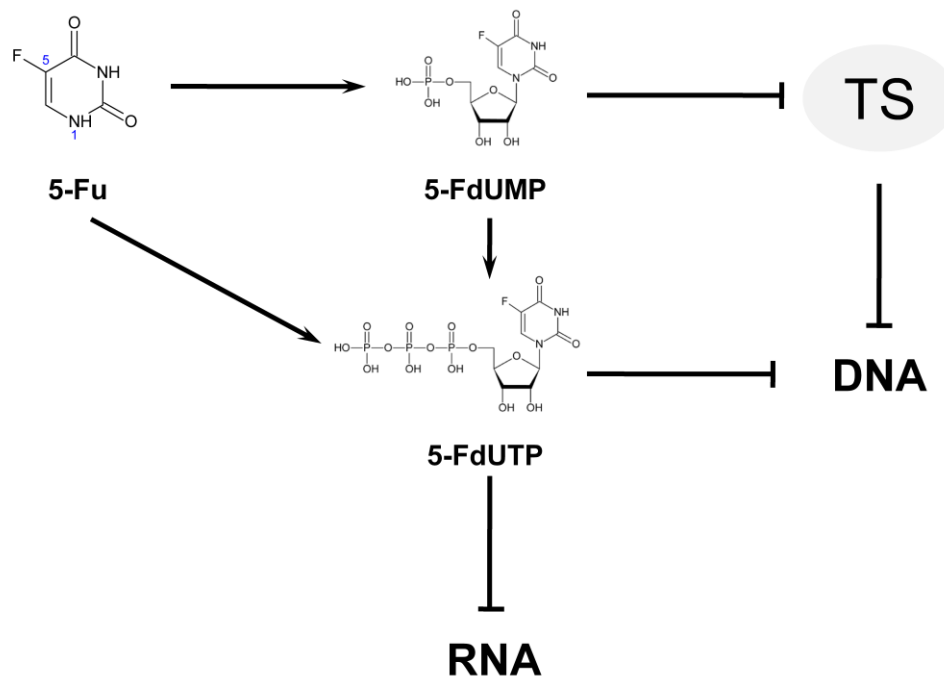


Abbildung 8: Schematische Darstellung der 5-Fu Angriffspunkte.

5-Fu kann die DNA-Synthese einerseits über die TS durch FdUMP und andererseits direkt durch FdUTP hemmen. Des Weiteren kann FdUTP die RNA Synthese hemmen.

Oxaliplatin

Oxaliplatin gehört zur Gruppe der Alkylantien und ist die INN-Bezeichnung für [[(1R, 2R)-1,2-Cyclohexandiamin-N,N']][oxalato(2-)-O,O']platin(II)] [105]. Der Name leitet sich von der Oxalsäure ab. Oxaliplatin ist die dritte Generation der Platinderivate (siehe Abbildung 9).

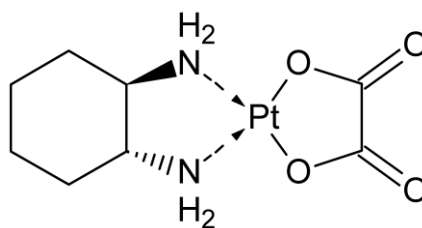


Abbildung 9: Die Strukturformel des Oxaliplatins.

Oxaliplatin unterliegt einer schnell ablaufend spontanen, nicht enzymatisch stattfindenden Biotransformation im Hepatozyten Plasma [106-109]. Diese Biotransformation erfolgt an der Oxalat-Gruppe durch die Abspaltung des Oxalats und dessen Ersatz durch Chloridionen, wobei ein Dichlorokomplex entsteht [110].

Der Mechanismus der intrazellulären Aufnahme des Dichlorokomplexes ist noch nicht vollständig geklärt; es werden derzeit aktive sowie passive Transportformen diskutiert [111, 112]. Im Zellinneren entstehen durch einen Ligandenaustausch von Chlorid gegen Phosphat oder Hydrogencarbonat sehr schnell Mono- und Diaquakomplexe [112]. Diese reagieren mit den Basen der DNA und führen zu Quervernetzungen innerhalb eines DNA-Stranges, sowie zwischen komplementären DNA-Strängen. Bevorzugt kommt es zu Verbindungen zwischen dem N7 des Guanins und oder dem N7 des Adenins. Als Folge dieser Quervernetzung verändert sich die räumliche Struktur der DNA und Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Molekülen gehen verloren. Es kommt zu Konformationsänderungen und schließlich zu Strangbrüchen [113].

Irinotecan

Irinotecan, auch CPT-11 genannt, ist die INN Bezeichnung für 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin [114]. Die Grundsubstanz wurde erstmals 1966 aus der Rinde, den Blättern und den Samen des Baumes *Camptotheca acuminata* isoliert [115].

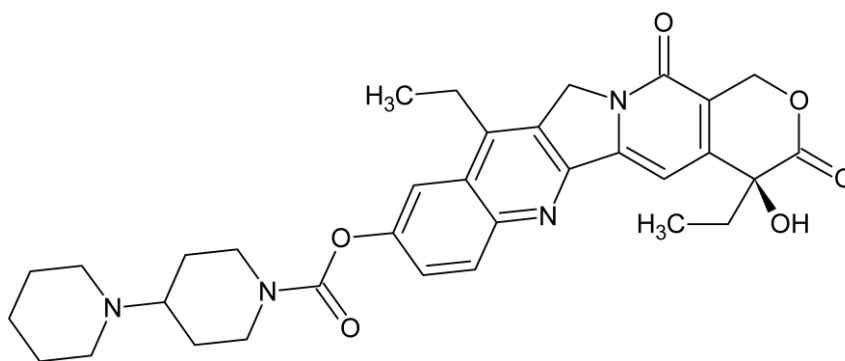


Abbildung 10: Die Strukturformel des Irinotecans.

CPT-11 gehört zur Gruppe der Topoisomerase-I-Hemmer. Als Topoisomerase-Hemmer wirkt es S-Phasenspezifisch während der DNA-Replikation. Es bindet an den Topoisomerase-I-DNA-Komplex und verhindert so den Wiederverschluss eines DNA-Einzelstrangbrüches.

Als Folge hiervon kommt es zu DNA-Doppelbrüchen, die letztendlich zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose führen [116, 117]. CPT-11 ist ein Prodrug und wird in der Leber unter Einfluss der Carboxylesterase zu dem ca. 1000-fach stärkeren Hemmstoff der Topoisomerase-I, SN-38 genannt, überführt [118]. Der Abbau erfolgt Cytochrom P3A4-abhängig [119].

Die Strahlentherapie

Die Strahlentherapie (Radiatio) ist neben der chirurgischen Intervention und der Chemotherapie eine der wichtigsten Säulen in der Behandlung von Tumoren. Im Gegensatz zur Chemotherapie ist die Bestrahlung eine lokale Therapievariante, die nur die bestrahlte Region betrifft, so dass Nebenwirkungen meist nur örtlich begrenzt auftreten. In den meisten Fällen ist die Bestrahlung eine gut verträgliche Therapie, bei der lediglich ca. 15% der Patienten schwerwiegende Nebenwirkungen erleiden. Zu diesen gehören u.a. Fibrosierungen und strahleninduzierte Sekundärtumore [120].

Von klinischer Bedeutung sind die energiereiche elektromagnetische Strahlung und die Teilchenstrahlung. Die Teilchenstrahlung benutzt ungeladene und geladene Teilchen wie Neutronen, Elektronen, Protonen oder Schwerionenstrahlung. Als Schwerionen gelten dabei alle Ionen, die schwerer als Wasserstoff sind. Das Spektrum der elektromagnetischen Strahlung reicht von den Radiowellen über das sichtbare Licht, bis hin zur energiereichen γ -Strahlung.

Die biophysikalischen Eigenschaften ionisierender Strahlung

Die Energieübertragung der für die Therapie verwendeten Strahlung auf anderen Molekülen erfolgt auf verschiedenen Wegen. Diese können einen direkten (wenn die Energieabsorption und Ionisation am gleichen Biomolekül stattfindet) bzw. einen indirekten biologischen Effekt (führt indirekt über verschiedene Zwischenschritte zur Bildung von u.a. *Reactive oxygen species* kurz ROS) auslösen [121-126]. Die für die Therapie verwendeten hochenergetischen Strahlungsarten wirken meist durch die Übertragung von Energie auf andere Moleküle [127]. Diese Energieübertragung erfolgt bei Photonenstrahlung meist über den Compton-Effekt, die Paarbildung und den photoelektrischen Effekt. Der photoelektrische Effekt beschreibt die

Energieübertragung der Photonen auf Elektronen aus einer inneren Elektronenschale eines Atoms. Der Compton-Effekt oder auch Ionisierung genannt, beschreibt dagegen die Übertragung der Energie auf ein Elektron aus einer äußeren Elektronenschale. Dabei wird nicht die gesamte Energie übertragen und die Photonen werden abgeschwächt und umgelenkt. Paarbildung kommt bei hochenergetischer Strahlung vor. Dabei kommen starke Wechselwirkungen zwischen einem Atomkern, einem Elektron und einem Positron zustande. Diese Effekte haben im Allgemeinen eines gemein, es entstehen freie Elektronen, die in der Lage sind, mit anderen Molekülen Wechselwirkungen einzugehen [128].

Durch die Bestrahlung sind alle Zellstrukturen betroffen. Das Hauptangriffsziel jedoch ist die Zerstörung der DNA durch Bildung von Einzelstrangbrüchen, Doppelstrangbrüchen, Basenschäden, Quervernetzungen (Crosslinks) und sog. Bulky Lesions (Strangbruch + Basenschaden + Crosslink) [126, 129].

Die Dosis definiert die Energie, die durch die Strahlung an die Materie übertragen wird (siehe Formel 1) [130]. Die Art und Anzahl der Schäden, die pro Gray entstehen, haben die Autoren Powells und Mc Millan 1990 in einer Arbeit publiziert. Nach den Angaben der Autoren entstehen bei 1 Gy u. a. 200 – 250 Bulky lesions, welche als Letalschaden anzusehen sind [131].

$$Dosis = \frac{absorbierteEnergie}{Masse} \rightarrow \left[Gy = \frac{J}{kg} \right]$$

Formel 1: Definition der Strahlendosis.

Die Einheit Gray [Gy] beschreibt die Energiedosis, welche durch die Strahlung an die Materie übertragen wird.

Das Grundprinzip eines Linearbeschleunigers

Mit einem Linearbeschleuniger lassen sich geladene Teilchen wie beispielsweise Elektronen, Positronen oder Ionen beschleunigen.

Ein einfacher Linearbeschleuniger, wie er in der Medizin verwendet wird, besteht aus einer Elektronenquelle, ähnlich einer Röntgenröhre, und einer Vakuumröhre mit wechselndem elektromagnetischem Feld. Die so erzeugten Elektronen werden, bevor diese auf die Anode treffen, auf ein Vielfaches beschleunigt. Beim Aufprallen auf die Anode entsteht die ionisierende Photonenstrahlung. Diese ist mit bis zu 23 MeV energiereicher als gewöhnliche Röntgenstrahlung [128].

Das Tiefendosismaximum wird dabei unter anderem von der Photonenenergie bestimmt. Je energiereicher Photonen sind, desto tiefer liegt das Dosismaximum im Gewebe und wird vom Aufbaueffekt bestimmt. Der Aufbaueffekt beschreibt dabei eine Summierung der Wirkung von Primärstrahlung und Sekundärelektronen. Diese Sekundärelektronen werden durch die Photonen erzeugt, welche auf die Haut treffen. Die Sekundärelektronen geben dabei ihre Energie im Gewebe ab und steigern somit die Dosis und haben eine praktische Bedeutung für die Schonung der Haut [128].

1.6 Die Apoptose

Kurze Zeit nach Etablierung der Zelle als „Grundeinheit des Lebens“ durch Schleiden und Schwann (1838) beschrieb Carl Vogt den „systematischen Zelltod“ während der Ontogenese der Geburtshelferkröte (1842) [132]. In den nachfolgenden Jahren wurden weitere Beobachtungen gemacht, bis schließlich über 100 Jahren nach Vogt durch Kerr et. al. (1972) und durch Wyllie (1980) der Begriff „Apoptose“ für den programmierten Zelltod charakterisiert wurde [133, 134]. Die Bezeichnung „Apoptose“ ist dem Altgriechischen entnommen, wo das Wort „*apoptosis*“ „Abfallen“ bedeutet und zur Beschreibung des Laubfalls benutzt wird [135].

Wie bereits Vogt erkannt hatte, ist die Apoptose essentiell für die Ontogenese. Des Weiteren hat sie physiologische Bedeutung in vielen Organsystemen als Antagonist der Proliferation und sorgt so für die Homöostase in Geweben. Weitere beachtliche physiologische Funktionen der Apoptose liegen in der Selektion von T-Lymphozyten während der Immunreifung und der Abschlussreaktion nach einer Infektion (*Activation Induces Cell Death*) [136]. So wird ersichtlich, dass Fehlregulationen der Apoptose schwerwiegende Folgen für den Organismus haben können, zum Beispiel die Karzinogenese, Autoimmunerkrankungen und degenerative Erkrankungen [137].

Apoptotische Zellen weisen eine Reihe von morphologischen Veränderungen auf, welche z.T. lichtmikroskopisch sichtbar werden. Die Apoptose geht mit Zellschrumpfung „*shrinkage*“, Karyopyknose und Asymmetrieverlust der Zellmembran einher. Des Weiteren kommt es zur *Karyohexis* mit anschließender Abschnürung von kleineren Zellkompartimenten mit konsekutiver Phagozytose durch Monozyten [138, 139].

Die Apoptose kann durch zwei Signalwege auf molekularer Ebene beschrieben werden: Den extrinsischen und den intrinsischen Signalweg.

Der extrinsische Signalweg

Dieser beschreibt eine rezeptorvermittelte Aktivierung der Apoptose. Diese kann über den sogenannten „Todesrezeptoren“ der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNF-R) erfolgen. Die Hauptvertreter dieser Gruppe sind Rezeptor-Tyrosinkinasen der integralen Membranproteine des Typ-I. Dies bedeutet, ihr C-Terminus befindet sich im Gegensatz zu den Typ-II auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran. Charakteristische Merkmale dieser Rezeptoren sind die extrazelluläre Cystein-Domäne und die intrazelluläre Todesdomäne. Namentliche Vertreter dieser Typ-I Rezeptoren ist der Fas-Todesrezeptor, auch CD95 (*cluster of differentiation 95*) bzw. *apoptosis antigen 1* (APO-1) genannt.

Die Initiierung der Apoptose erfolgt nach Ligandenbindung und Aktivierung des Todesrezeptors.

Durch diese Aktivierung trimerisieren die Rezeptoren. Über diese Konformationsänderung des Rezeptors können an den Todesdomänen Adaptermoleküle wie TRADD (*Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein*), FADD (*Fas-associated death domain protein*) u.a. mit ihren eigenen Todesdomänen binden. Das Adapterprotein FADD kann über seine Todeseffektordomäne mit Procaspase 8 interagieren. Es entsteht ein Komplex, welcher aus Rezeptor, TRADD, FADD und Procaspase 8 besteht und *Death inducing signaling complex* (DISC) genannt wird.

Dieser induziert die autoproteolytische Prozessierung und Aktivierung von Caspase 8 (siehe Abbildung 11) [140].

Caspasen sind Proteasen mit Cystein im aktiven Zentrum, welche nach einem Aspartat-Molekül die Proteinkette spalten (**CysteinyI-aspartate-specific protease**) [141, 142]. Caspase 8 steht so am Anfang einer langen Caspase-Signalkaskade und wird „Initiationscaspase“ genannt. Diese Initiationscaspase vermag über Zwischen-Caspasen die Aktivierung von Exekutivcaspasen (Caspase 3, 6, 7) auslösen. Dies führt dann zum unwiderruflichen Zelltod.

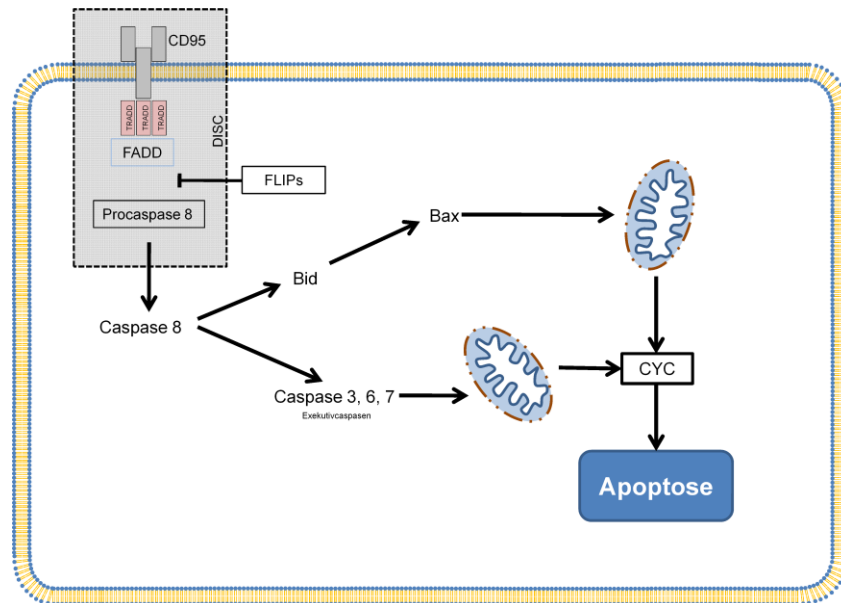


Abbildung 11: Der extrinsische Signalweg der Apoptose.

Nach Aktivierung des Rezeptors erfolgt eine Rekrutierung der Adaptorproteine TRADD, FADD mit konsekutiver Bindung von Procaspase 8 und Bildung des DISC-Komplexes. Im Anschluss erfolgt die autoprotolytische Prozessierung von Caspase 8 und die Aktivierung der Exekutivcaspasen bzw. von Bax, die durch Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran Cytochrom C freisetzen und somit die Apoptose einleiten. FLIPs sind homolog zu Caspase 8 und können somit den extrinsischen Weg hemmen. Abbildung modifiziert nach Schafer et al. [143].

Der intrinsische Signalweg

Beim intrinsischen Signalweg der Apoptose stehen die Mitochondrien im Mittelpunkt. Bei einer DNA Schädigung wie beispielsweise durch Zytostatika oder hochenergetische Strahlung kommt es zu der Aktivierung des Proteins p53 und somit zur Aktivierung und Integration von proapoptotischen Proteinen der *B-Cell Lymphoma 2*-Familie (BCL-2) in der mitochondrialen Membran.

Dies führt zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$. Die Konsequenz hiervon ist die Degradierung der mitochondrialen Membran mit konsekutiver Freisetzung mitochondrialer Bestandteile. Hier muss besonders das Cytochrom C (CYC) erwähnt werden. Cytochrom C ist im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert und an der Atmungskette beteiligt. Die Freisetzung von Cytochrom C gilt als irreversibler Schritt der Apoptose [144]. Cytochrom C bindet an das Regulatorprotein *apoptotic protease activating factor 1* (Apaf-1) und legt dadurch die Bindungsstelle für Procaspase 9 frei [145].

Es entsteht ein Heptamer aus jeweils sieben Apaf-1- und sieben Caspase-9-Molekülen, welches als „Apoptosom“ bezeichnet wird.

Das Apoptosom führt zur autokatalytischen Prozessierung von Procaspase 9.

[146] Es folgen analog, wie bereits im extrinsischen Weg beschrieben, die Aktivierung der Exekutivcaspase 3 und somit die Apoptose.

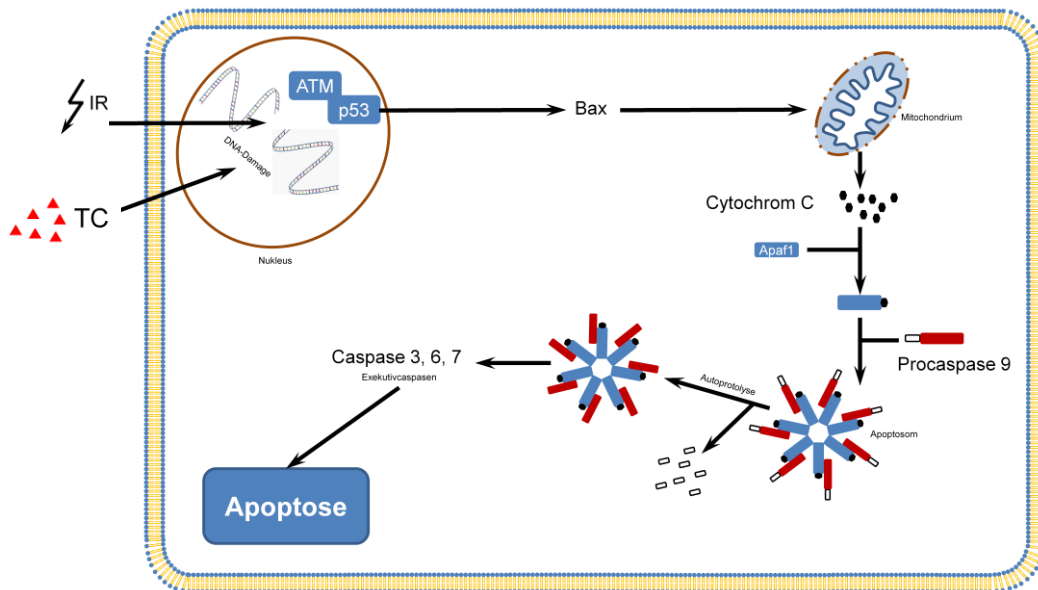


Abbildung 12: Schematische Darstellung des intrinsischen Signalweges der Apoptose.

Nach Aktivierung von ATM bzw. p53 aufgrund eines DNA-Schadens durch IR oder TC (Toxic Component), erfolgt die Rekrutierung u.a. von Bax. Dies führt zu einem Verlust des Mitochondrialenmembranpotentials mit konsekutiver Freisetzung von Cytochrom C. Im Anschluss bildet sich ein Apoptosom, bestehend aus Apaf1, Cytochrom C und Procaspase 9. Es folgt die autoprotolytische Prozessierung von Caspase 9 und die Aktivierung der Exekutivcaspasen und somit die Einleitung der Apoptose. Abbildung modifiziert nach Schafer et al. [143].

Regulation der Apoptose

Funktionsstörungen in der apoptotischen Signalkaskade können verheerende Folgen für den Organismus haben. Deswegen unterliegt die apoptotische Signalkaskade einer genauen Kontrolle. Inhibitorische sowie exzitatorische Proteine können an verschiedenen Stellen der Apoptose eingreifen. Eine nennenswerte Regulationmethode des extrinsischen Weges ist seine Hemmung auf der Stufe der Caspase 8-Aktivierung.

Hierbei spielen die „*FADD-like-Interleukin-1 β -converting-enzyme-proteasen*“ (FLIPs) eine essentielle Rolle. FLIPs sind zur Caspase-8 homolog, besitzen aber keine enzymatische Aktivität. So können FLIPs zum DISC aktivierter Todesrezeptoren rekrutiert werden und die Apoptose kompetitiv zu Procaspase 8 hemmen (siehe Abbildung 11) [147, 148].

Eine weitere Klasse regulatorischer Proteine der Apoptose sind die „*inhibitor of apoptosis-Proteine*“ (IAPs). Diese hemmen in erster Linie Caspasen. Die verschiedenen IAPs können u.a. die Caspasen 3, 7, 9 binden und somit diese inaktivieren [149, 150]. Darüber hinaus spielen diese Proteine auch eine wichtige Rolle in der Mitose [151].

Die BCL-2 Proteinfamilie

Die Proteine der BCL-2 Familie sind unmittelbar an der Regulation der Apoptose beteiligt [152]. Namensgebend für das Gen BCL-2 stand die Beobachtung, dass 80 % der Patienten mit einem B-Zell-Lymphom infolge einer

Tabelle 1: Die Mitglieder der BCL-2 Familie und deren Funktion auf die Apoptose.

Proapoptotisch	Antiapoptotisch
Bax	Bcl-2
Bad	Bcl-xL
Bak	Mcl-1
Bid	A1
Puma	
Noxa	

Chromosomentranslokation t(14,18) das Onkogen Bcl-2 überexprimieren und so die Apoptose umgehen [153]. Die BCL-2 Familie kann grob in zwei Subtypen unterteilt werden. Zum einen gibt es die antiapoptotisch wirkende Gruppe. Dies sind vor allem Bcl-2 und Bcl-xL u.a. Andererseits existieren die proapoptitisch agierenden Bax, Bad, Bak, Bid, PUMA und Noxa u.a. (siehe Tabelle 1).

Die Einteilung der BCL-2 Familienmitglieder in eine der zwei Gruppen wird durch das Vorhandensein von mindestens einer von vier möglichen konservierten α -helikalen BCL-2 homologen Domänen, kurz BH-Domänen bestimmt [154, 155].

Charakteristisch für die Mitglieder der proapoptotisch wirkenden Gruppe ist die BH3-Domäne, die auch zytotoxische Domäne genannt wird. So wird als Antwort auf ein Apoptosesignal beispielsweise Caspase 8 aktiviert. Caspase 8 überführt Bid zu tBid, welches die Fähigkeit hat, Bax und Bak zu aktivieren (siehe Abbildung 11). Bax und Bak liegen im inaktivem Zustand als Monomere im Zytosol vor. Durch ihre Aktivierung wird ihr N-Terminus frei und es entstehen Homooligomere, die in die äußere mitochondriale Membran integriert werden und so zur Freisetzung von Cytochrom C führen [152, 156, 157].

Die Antagonisten Bcl-2 und Bcl-xL, die u.a. als integrale mitochondriale Membranproteine vorliegen, können sowohl Bax als auch Bak binden und so die Porenbildung verhindern.

Der weitere Subtyp der proapoptotischen Gruppe besitzt nur die BH3-Domäne. Diese Proteine der BH3-only-Gruppe wirken als Mediatoren, indem sie die antiapoptischen BCL-2-Proteine inhibieren bzw. Bak und Bax aktivieren. Entscheidend für die Einleitung der mitochondrialen Apoptose ist das Verhältnis der pro- zu antiapoptotisch wirkenden BCL-2 Mitglieder [158].

Die Regulation der BCL-2-Typen unterliegt dabei komplexen Mechanismen. So induziert das Tumorsuppressorgen p53 die Transkription von Bax, Puma und Noxa und reprimiert die Expression von Bcl-2 und Bcl-xL [159]. Des Weiteren wird die proapoptotische Wirkung von Bad durch Phosphorylierung durch die Proteinkinase B gehemmt [160, 161].

1.7 Die Nekrose

Dem programmierten Zelltod (Apoptose) steht die Nekrose gegenüber. Charakteristisch für die Auslösung einer Nekrose ist die unphysiologische Funktionsstörung der Zellmembran [133, 162]. Diese wird u.a. durch mechanische, chemische oder thermische Faktoren sowie energiereiche Strahlung bzw. einen Sauerstoff- oder Energiemangel ausgelöst. Die Zellmembran verliert dabei an Integrität, und Elektrolyte und somit Wasser können in die Zelle einströmen. Es kommt zur Zellschwellung und schließlich zum Platzen der Zelle. Charakteristisch hierfür sind die Karyolyse sowie die Freisetzung von lysosomalen Enzymen, Zytoplasma und zellulären Degradationsprodukten. Diese Freisetzung hat *in vivo*, als wesentlichen Unterschied zur Apoptose, eine Entzündungsreaktion mit chemotaktischer Anlockung von Makrophagen zur Folge [163].

1.8 Mitose und Zellzyklus

Allein durch Vermehrung der DNA und konsekutiver Teilung der Zelle sind im Laufe der Evolution vielzellige Organismen entstanden. Die Mitose spielt in jeglichem Leben eine essentielle Rolle. Aufgrund dessen bedarf die Mitose einer strengen Kontrolle. Diese Kontrolle bedarf eines hochkomplexen Mechanismus aus intrinsischen und extrinsischen Signalwegen, die hier aufgrund ihrer Komplexität nur grob besprochen werden.

Der Zellzyklus beschreibt die Gesamtheit aller Zellvorgänge, die zu Wachstum, Replikation und Teilung beitragen. Der Zellzyklus lässt sich anhand des DNA-Gehalts der Zelle in die G_1 -, S- und G_2 -Phase einteilen.

Die erste Phase, die G_1 -Phase, ist durch Zellwachstum und Synthese von Proteinen, aber nicht durch Synthese von DNA charakterisiert, weswegen der DNA-Gehalt in dieser Phase $2n$ beträgt. Die S-Phase, auch Synthesephase genannt, schließt sich der ersten Phase an. Sie ist durch rege Verdoppelung der DNA charakterisiert. Es folgt die G_2 -Phase, in welcher sich die Zelle auf die bevorstehende Mitose vorbereitet [164].

Die Dauer des Zellzyklus ist spezies- und zellspezifisch und beträgt bei schnell wachsenden Säugerzellen ca. 24 Stunden. Dabei fallen etwa 12 Stunden in die G₁-Phase, jeweils 6 Stunden in S- sowie G₂-Phase und ca. 30 Minuten in die Mitose [165-167].

Ausdifferenzierte Zellen, wie beispielsweise Neurone, können diesen Zyklus verlassen und befinden sich dann definitionsgemäß in einer G₀-Phase [168].

Die Kontrolle der Mitose kann dabei extrinsisch oder intrinsisch erfolgen. Extrinsisch wird sie durch Kontakte zu extrazellulären Matrix und Nachbarzellen, über Nährstoffe, sowie über Hormone und Wachstumsfaktoren wie Androgene, Glukokortikoide, Erythropoetin und weitere gesteuert.

Die intrinsische Steuerung erfolgt über einen hochkomplexen Regelkreis. Hierfür spielen Zykline eine wesentliche Rolle. Diese sind Aktivatoren der Zyklin-abhängigen-Proteinkinasen, kurz CDK genannt. Während die Proteinkinasen immer vorhanden sind, sind die Zykline meist nur phasenspezifisch in der Zelle zu finden. Die Aktivität der CDKs unterliegt nicht nur der Aktivierung durch die Zykline, sondern auch der Phosphorylierung und Dephosphorylierung durch beispielsweise CDK-aktivierende-Kinase (CAK) und Interaktionen mit CDK-Inhibitoren (CKI). Dabei ist nur das Heterodimer aus Zyklin und Proteinkinase in der Lage, weitere Transkriptionsfaktoren zu aktivieren [145, 169].

Wie bereits beschrieben, ist die Expression bestimmter Zykline phasenabhängig. Dabei fungieren diese phasenabhängig unterschiedlichen Zyklin-Spiegel als „Lotse“ zum Passieren von Restriktionspunkten, auch Checkpoints genannt. Die wichtigsten Restriktionspunkte sind der G₀-, G₁-, G₂- und der M-Phase-Restriktionspunkt. An diesen Checkpoints kommen spezifische Kontrollmechanismen vor. So wird während des G₁- und G₂-Restriktionspunktes die DNA auf Schäden kontrolliert, während des M-Phase-Restriktionspunktes der Spindelapparat kontrolliert wird [170, 171].

G₁/S Übergang

Der G₁/S-Übergang wird durch das Rb-Protein gewährleistet. Das Protein Rb ist ein Tumorsuppressor. Der Name des Rb-Proteins stammt von Mutationen des Rb-Proteins, welche in Retinoblastomen gefunden wurden [172]. Wichtig ist der Zyklin-D/CDK4-Komplex. Dieser Komplex phosphoryliert den Rb/E2F. Durch eine weitere Phosphorylierung des Rb/E2F-Komplexes durch den Zyklin-E/CDK2-Komplex entlässt Rb den E2F. Dieser führt dann zur Transaktivierung der für die S-Phase benötigten Proteine [173]. Diese Aktivierung von Rb kann beispielsweise durch p21 gehemmt werden.

Das Protein p21 wird von p53 transaktiviert. Durch diese Aktivierung hemmt p21^{WAF1} den Cyclin D/cdk4-/ Cyclin E/cdk2-/ und Cyclin A/cdk2 Komplex. Dadurch wird die Zelle in der G₁-Phase gehalten [37].

G₂/M Übergang

Die Aktivierung der Cdc25C-Phosphatase durch 14-3-3 α führt zur Dephosphorylierung des Cyclin-B/cdk1-Komplexes an Threonin 14 und Tyrosin 15. Durch diese Dephosphorylierung wird der Komplex aktiviert, und die Zelle kann in die M-Phase übergehen [174, 175].

Zellzyklussteuerung durch p53

P21 und 14-3-3 α werden von p53 transaktiviert. Des Weiteren wird durch p53 das *Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45 Protein* (Gadd45) transaktiviert. Gadd45 kann ebenfalls den Cyclin B/cdk1-Komplex hemmen, was zu einem Zellzyklusarrest in der G₁-Phase führt [176].

Dadurch kann beispielsweise bei genotoxischem Stress p53 einen Zellzyklusarrest in der G₁- und G₂-Phase auslösen. Durch diesen Arrest kann die Zelle Reparaturmechanismen ausführen oder, bei schwerem irreparablen Schaden, die Apoptose auslösen.

1.9 Der MAPK-Signalweg

Die Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinasen (MAPK) nehmen in den Signaltransduktionswegen eine wichtige Position ein [26]. Diese Kinasen aktivieren eine Vielzahl von Proteinen und Transkriptionsfaktoren. Je nach Zelle können durch die gleichen Kinasen unterschiedliche Funktionen ausgelöst werden [177-179]. Die durch MAPK ausgelösten Kaskaden werden nach ihren jeweiligen Effektor-kinasen benannt. Die Hauptfunktionen der MAPK liegen in der Proliferation, der Zelldifferenzierung, sowie der anti- und proapoptischen Wirkung.

In Mammaliazellen sind drei häufige Transduktionswege bekannt [177]. Diese Kaskaden werden nach ihren Effektor-kinasen benannt.

Bei dem KRK spielt die Ras-/ Raf-/ Mek-/ ERK-Kaskade eine wesentliche Rolle. Wie bereits erwähnt ist Ras ein integrales G-Protein, welches beispielsweise über den EGF-Rezeptor aktiviert werden kann. Durch diese Aktivierung kann Ras die MAP3K-Kaskade aktivieren, über die am Ende die Familie der *Extracellular-signal Regulated Kinases* kurz ERK-Familie genannt aktiviert wird [177].

Erk aktiviert wiederum verschiedene Transkriptionsfaktoren, die bei der Regulation der Mitose und Proliferation eine wichtige Rolle spielen [177, 179]. Die Regulation dieser Kaskade wird u.a. von Negative-Feedbacks bestimmt. Hierbei wird durch ERK, beispielsweise *Sprouty homolog 2* (SPRY2) aktiviert, welches Ras hemmen kann [180-183]. Dadurch kann sich die Zelle auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren selbstständig mit mitogenen Signalen versorgen. Ras-Mutationen kommen bei etwa 40 % aller KRK vor [184-187]. Die weiteren Kaskaden sind die p38- und die JNK-Kaskade. Diese werden u.a. durch Stressoren aktiviert [177].

1.10 Fragestellung

Trotz enormer Anstrengung in der Darmkrebsvorsorge und -therapie bleibt das Kolonkarzinom im fortgeschrittenen Stadium meist inkurabel. Dies liegt größtenteils an der Bildung von Fernmetastasen, die eine effektive, kurative Therapie beeinträchtigen. Anders als beispielsweise bei den Leukämien und den Mammakarzinomen, die u. a. mit mutationsabhängigen Antikörpern behandelt werden, berücksichtigt die etablierte Therapie mit Folinsäure, 5-Fu und Oxaliplatin (FOLFOX) bzw. das Schema aus Folinsäure, 5-Fu und CPT-11 (FOLFIRI) ggf. in Kombination mit IR kaum die Intrazellulären- bzw. Karzinommutationen (neuere Behandlungsprotokolle mit anti-EGFR und anti-VEGFR ausgenommen).

Zur Untersuchung der Frage, ob p53-vermittelte Funktionen die Antitumoreffektivität etablierter Chemotherapeutika, wie 5-Fluoruracil, Irinotecan und Oxaliplatin jeweils als Einzelsubstanz oder in Kombination mit einer Strahlentherapie beeinflussen, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene *in vitro* p53-knock-out Kulturen kolorektaler Karzinome herangezogen.

Die Analysen zur Sensitivität der verwendeten Chemotherapeutika, der Radiatio (IR) oder der Kombination aus IR und Substanzen gegenüber den KRK-Zelllinien bei unterschiedlichem p53-Status wurden auf mehreren Ebenen durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen morphologisch charakterisiert. Im Anschluss folgte im Hinblick auf die Apoptoseinduktion, die durchflusszytometrische Bestimmung der Chemo- und Radiosensitivität. Dies wurde mittels der Proteinexpression durch das Western Blot Verfahren verifiziert. Zudem folgten Zellzyklusanalysen und Assays zur zellulären Proliferation.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Zelllinien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (siehe Tabelle 2) standen der Arbeitsgruppe zu Beginn der Untersuchung bereits zur Verfügung und stammten aus dem Labor Dr. Vogelstein (JHU, Baltimore, MD). Die verwendeten Nährmedien sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Zelllinien und verwendetes Nährmedium

Zelllinie	Nährmedium
HCT116 p53 +/+	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
HCT116 p53 -/-	Dulbecco's Modified Eagle Medium
RKO p53 +/+	Dulbecco's Modified Eagle Medium
RKO p53 -/-	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DLD-1 p53 +/+	McCoy's 5A
DLD-1 p53 -/-	McCoy's 5A

Nährmedien

Die Zusätze für die Nährmedien sind in Tabelle 3 zu sehen.

Tabelle 3: Nährmedienzusätze

Nährmedium	Zusätze	
DMEM	10 % 100 U/ml 100 mg/ml	FBS Penicillin Streptomycin
Mc Coy's 5A	10% 100 U/ml 100 mg/ml	FBS Penicillin Streptomycin

Laborgeräte

CO ₂ -Brutschrank	Heraeus	Hanau, D.
Durchflusszytometer FACSCalibur®	Becton, Dickinson and Company	Fanklin Lakes, USA.
Durchflusszytometrieröhrchen	Becton, Dickinson and Company	Fanklin Lakes, USA.
Einfrierbehälter : Mr. Frosty™	Thermo-Fisher Scientific	Waltham, USA.
Gelelektrophoresesystem BioRad Criterion™ System	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA.
Heizblock	neoLab Migge GmbH	Leonberg, D.
Infrared Imager LI-COR Odyssey®	LI-COR Biosciences	Lincoln, USA.
Invertlichtmikroskope:	Helmut Hund GmbH Carl Zeiss AG	Wetzlar, D. Oberkochen, D.
Kryoröhrchen	Thermo-Fisher Scientific	Waltham, USA.
Linearbeschleuniger: Elekta Synergy 15 MV	Elekta Oncology Systems	Crawley, UK.
Microplate Reader MR7000	BioTek Instruments, Inc.	Winooski, USA.
Mikropipetten	Eppendorf AG	Hamburg, D.
Netzgerät: BioRad PowerPac™	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA.
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One	Kremsmünster, A.
Pipettierhilfe, PIPETBOY®	Integra Biosciences AG	Zizers, Schweiz
Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One	Kremsmünster, A.
Steppipette	Eppendorf AG	Hamburg, D.
Sterilwerkbank	Heraeus	Hanau, D.
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc.	Bohemia, USA.
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co KG	Uetze, D
Western Blot Kammer: BioRad Criterion™ System	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA.
Zählkammer nach Neubauer	Carl Roth GmbH & Co KG	Karlsruhe, D.

Zellkulturflaschen	Becton, Dickinson and Company	Fanklin Lakes, USA.
Zellkulturplatten	Becton, Dickinson and Company	Fanklin Lakes, USA.
Zentrifugen:		
Centrifuge 5412 R	Eppendorf AG	Hamburg, D.
Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH & Co KG	Karlsruhe, D.
Varifuge 3.0 RS	Heraeus	Hanau, D.

Chemikalien

5-Fluoruracil	Universitätsapotheke Tübingen	Tübingen, D.
Annexin Binding Buffer 10X	Becton, Dickinson and Company	Fanklin Lakes, USA.
Annexin V	Becton, Dickinson and Company	Fanklin Lakes, USA.
Aprotinin	Sigma-Aldrich GmbH	St. Louis, USA
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich GmbH	St. Louis, USA
Bradford-Reagenz, Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad	München, D.
BSA	Sigma-Aldrich GmbH	St. Louis, USA
Criterion™ XT Bis-Tris 12 % Precast Gels	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA.
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH	Darmstadt, D.
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA	Darmstadt, D.
Fötales Kälberserum	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Glycin	BioRad	München, D.
Irinotecan	Universitätsapotheke Tübingen	Tübingen, D.
Leupeptin	Sigma-Aldrich GmbH	St. Louis, USA
Mc Coy's 5A Medium	Thermo-Fisher Scientific	Waltham, USA.
McCoy's 5A	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Methanol	Merk KGaA	Darmstadt, D.

NaCl 0,9 %	Merck KGaA	Darmstadt, D.
NaF	Sigma-Aldrich GmbH	St. Louis, USA
Natriumpyrophosphat (Na ₄ P ₂ O ₇)	Sigma-Aldrich GmbH	St. Louis, USA
Nitrozellulose-Membran	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA.
Oxaliplatin	Sigma-Aldrich GmbH	St. Louis, USA
Pefabloc	Sigma-Aldrich GmbH	St. Louis, USA
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml / 10.000 mg/ml	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Pepstatin A	Sigma-Aldrich GmbH	St. Louis, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail I	Sigma-Aldrich GmbH	St. Louis, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma-Aldrich GmbH	St. Louis, USA
Phosphatpuffer-Natriumchlorid (PBS)	PAA Laboratories GmbH	Cölbe, D.
Preastained Protein Ladder: Page Ruler Plus	Thermo-Fisher Scientific	Waltham, USA
Propidiumiodid	Thermo-Fisher Scientific	Waltham, USA.
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich GmbH	St. Louis, USA
Ripa Puffer	Sigma-Aldrich GmbH	St. Louis, USA
RNase A	Sigma-Aldrich GmbH	St. Louis, USA
Sheath Fluid: BD FACSTFlow™	Becton, Dickinson and Company	Fanklin Lakes, USA.
Tris	Sigma-Aldrich GmbH	St. Louis, USA
Trypanblau 0,4%	Thermo-Fisher Scientific	Waltham, USA
Trypsin-EDTA 0,05 % / 0,02 % (w/v)	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Tween 20	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA.
Wasser Deionisierer: Milli-Q® Reinstwasserlösungen	Merck KGaA	Darmstadt, D.
XT MOPS Running Buffer 20X	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA.
XT Reducing Agent 20X	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA.
XT Sample Buffer 4X	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA.
XTT-Assay: In Vitro Toxicology Assay Kit	Sigma-Aldrich GmbH	St. Louis, USA

Antikörper

α -Tubulin, Artikel-Nr.: 2144	Cell Signaling	Danvers, USA
Anti-Mouse IgG, Artikel-Nr.: 4408	Cell Signaling	Danvers, USA
Anti-Rabbit IgG, Artikel-Nr.: 4414	Cell Signaling	Danvers, USA
Cleaved Caspase-3, Artikel-Nr.: 9664	Cell Signaling	Danvers, USA

Software

Durchflusszytometrische-Analyse:

CellQuest Pro™ 4.0.2	Becton, Dickinson and Company	Fanklin Lakes, USA.
----------------------	-------------------------------	---------------------

Büroanwendungen:

Excel 2010	Microsoft	Redmond, USA.
Word 2010	Microsoft	Redmond, USA

Statistik:

CompuSyn	ComboSyn, Inc.	Paramus, USA.
OriginLab 8	OriginLab	Northampton, USA.
SPSS 19	IBM	Armonk, USA

Mikroskopiersoftware:

ImageJ64	National Institutes of Health	Bethesda, USA.
Zen	Carl Zeiss AG	Oberkochen, D.

Mikroplate Reader-Analyse:

BioLinx 2.0	Dynatech Labarotaries Inc.	Chantilly, USA.
-------------	----------------------------	-----------------

Western Blot Analysen:

Image Studio™	LI-COR Biosciences	Lincoln, USA.
---------------	--------------------	---------------

Bildbearbeitung:

IrfanView	Irfan Škiljan	Wiener Neustadt, A.
Photoshop CS2	Adobe Systems	San José, USA

2.2 Methoden

Die Kultivierung von Zelllinien

Die adhärennten Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in 75 cm² großen Gewebekulturflaschen mit jeweils 15 ml Medium kultiviert. Die Zellen wurden täglich unter einem Invertmikroskop auf Vitalität, Konfluenz und Kontaminationen untersucht.

Die Passagierung der Zellen erfolgte alle zwei Tage nach Erreichen einer ca. 80 %igen Konfluenz. Hierzu wurde das Medium dekantiert und die Zellen mit PBS gewaschen, dies erfolgte u.a., um Zelldebris und überschüssige divalente Kationen zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 4 ml einer 0,05/0,25 %igen Trypsin-EDTA-Lösung. Dabei baut die enthaltene Endopeptidase die interzellulären Peptidbindungen ab und EDTA komplexiert das für Cadherine essentielle Ca²⁺ [188].

Nach entsprechender Inkubation im Brutschrank und sanftes Beklopfen der Flaschen wurden die Zellen in Suspension gebracht. Im direkten Anschluss wurde mit den entsprechenden Nährmedien (siehe Tabelle 2) meist eine 1:15 Suspension hergestellt, dabei wird das Trypsin-EDTA durch das Medium inaktiviert. Die hierfür nicht verbrauchten Zellen wurden für Versuche verwendet, kryokonserviert oder verworfen.

Die Zellkulturen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit in einem Zellinkubator aufbewahrt. Alle Zellkulturmethoden fanden unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-Flow-Werkbank statt.

Die Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde manuell bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit Trypanblau-Lösung gefärbt und lichtmikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Trypanblau ist ein polyanionischer Azofarbstoff, der die intakte Zytoplasmamembran vitaler Zellen nicht passieren kann [189]. Dies bedeutet, dass im Gegensatz dazu avitale Zellen aufgrund der Permeabilität ihrer defekten Zellmembran blau gefärbt werden.

Für die Färbung wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau sowie 80 µl PBS in ein Reaktionsgefäß gegeben. Von dieser Suspension wurden 10 µl auf die Zählkammer gegeben und unter einem Invertmikroskop die vier äußeren Felder mit je 16 Quadranten ausgezählt.

Für die Berechnung der in 1 ml Suspension enthaltenen Zellen wurde die folgende Formel angewandt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{"vitale" Zellen}}{\text{gezählte Felder}} \times 10^5$$

Formel 2: Bestimmung der Zellzahl je ml Suspension.

Die Kryokonservierung und das Auftauen eukaryontischer Zellen

In Zellen, die in Kulturen gehalten werden, können Veränderungen der Zellgenetik durch äußere Faktoren, wie beispielsweise falscher Passagierung oder Nährstoffmangel aufgrund zu hoher Zelldichte etc., auftreten. Aus diesem Grund wurden Zellen in einer frühen Passage eingefroren.

Bei der Trypsinierung wurde das gleiche Vorgehen wie bei der Kultivierung von Zelllinien benutzt. Die gesamte Zellsuspension sowie 15 ml Medium wurden in ein 50 ml Zentrifugationsgefäß gegeben und bei 1.200 upm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet in 5 °C kaltes, jeweils zur Zelllinie passendes Freezingmedium resuspendiert.

Das Freezingmedium wurde frisch aus Medium (siehe Tabelle 3) mit 40 % DMSO angesetzt. DMSO verdrängt aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften Wasser aus der Zelle und verhindert so, während es langsam abkühlt, die Entstehung von Eiskristallen innerhalb der Zellen und somit die Zerstörung ihrer Zellmembran [190].

Es wurden jeweils ca. 1,5 Mio. Zellen je ml Freezingmedium aufgenommen und eingefroren. Dies erfolgte in einer *Freezing Box*. Hier wurden die Kryoröhrchen hineingegeben und bei -80 °C eingefroren. Die *Freezing Box* ist mit Ethanol gefüllt und kühlt somit die Zellen schonend langsam mit -1 °C/min ab. So konnten aus einer 75 cm² großen Gewebeskulturflasche drei bis vier Aliquots hergestellt werden.

Um die Zellen wieder aufzutauen, wurde ein Kryoröhrchen in einem 37 °C warmen Wasserbad erwärmt und zügig in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen mit 20 ml Medium gegeben und bei 1.200 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in Medium plus 20 % FBS wieder aufgenommen und in eine Gewebskulturflasche überführt.

Die Bestimmung der Verdopplungszeiten

Die Verdopplungszeit, auch Generationszeit genannt, ist die Zeit zwischen zwei Zellteilungen. Für die Bestimmung der Verdopplungszeit wurden die Zellen in bekannter Zellzahl in 96-Well-Platten ausgesät und jeweils nach 24, 48 und 72 h lichtkroskopisch an einem Phasenkontrastmikroskop fotografiert. Im Anschluss erfolgte die Auszählung des gesamten Sichtbarenfeldes. Dies erfolgte mittels der ImageJ[®] Software.

Die Verdopplungszeit wurde nach der Funktion der Exponentialgleichung berechnet [191]. Hierfür muss zunächst Wachstumskonstante μ nach Formel 3 berechnet werden. Im Anschluss wurde die Verdopplungszeit t_d mit der Formel 4 berechnet. Durch Integration beider Formeln erhält man Formel 5.

$\mu = \frac{\ln(x_t) - \ln(x_0)}{t - t_0}$	t_0	= Zeitpunkt 0	[h]
	t	= beobachteter Zeitpunkt	[h]
	x_0	= Zellzahl zum Zeitpunkt 0	
	x_t	= Zellzahl zum Zeitpunkt t	
	μ	= Wachstumskonstante	[h ⁻¹]
	t_d	= Verdopplungszeit	[h]

Formel 3: Berechnung der Wachstumskonstante μ .

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Formel 4: Berechnung der Verdopplungszeiten t_d .

$$t_d = \frac{\ln(2) * t}{x_t - x_0}$$

Formel 5: Integrierte Formel zur Berechnung der Verdopplungszeiten t_d .

Die Behandlung der Zellen

Die chemotherapeutische Behandlung

Die Zellbehandlung erfolgte in 6-Well-Platten. Hierfür wurden die Zellen ausgesät und 24 h im Inkubator bebrütet. Am Folgetag wurde der Kulturüberstand durch das entsprechende frische Nährmedium ersetzt und mit den Therapeutika behandelt. Das Endvolumen betrug dabei 4 ml je Well. Als Negativkontrolle wurde immer ein unbehandeltes Well mitgeführt. DMSO, welches als Lösungsmittel Anwendung fand, wurde ebenfalls in entsprechender Konzentration mitgeführt. Nach 48- bzw. 72-stündiger Inkubation erfolgte die Auswertung.

Die Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt.

Die Bestimmung des zytotoxischen Potentials einzelner Therapeutika

Zu Beginn der Arbeit sollte zunächst die Chemosensitivität der einzelnen Zellen untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen entsprechend Tabelle 4 in den verschiedenen Konzentrationen behandelt, entsprechend inkubiert und im Anschluss durchflusszytometrisch quantifiziert.

Tabelle 4: Verwendete Konzentrationen

Therapeutikum	Verwendete Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$]							
5-Fluoruracil	2,5	10	20	50	200	500		
Irinotecan	5	10	25	50	100	250		
Oxaliplatin	0,5	2,5	5	10	25	50	100	250

Die Bestrahlung mit ionisierender Strahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte am medizinischen Patientenstrahlplatz der Universitätsklinik für Radioonkologie Tübingen.

Der Transport der Zellen in die radioonkologische Universitätsklinik Tübingen erfolgte in Polystyrolboxen.

Zur genauen Positionierung der 6-Well-Platten dienten Laserstrahlen, die das Isozentrum des Strahls auf den Boden der Platten und somit auf die adhären wachsenden Zellen projizierten. Der für die Bestrahlung wichtige Aufbaueffekt der Photonenstrahlung wurde hierbei berücksichtigt.

Während der Bestrahlung wurden die Zellen bei Raumtemperatur gehalten. Transport und Bestrahlung betrug circa 15 Minuten. Im Anschluss wurden die Zellen rasch wieder im Zellinkubator aufbewahrt. Die unbestrahlten Kontrollzellen wurden gleichen Bedingungen wie die bestrahlten Zellen bezüglich Transport und Lagerung während der Bestrahlung ausgesetzt.

Nach 48- bzw. 72-stündiger Inkubation erfolgte die Auswertung.

Die Konzentrationen für die Kombinationsversuche aus IR und Substanzen sind in Tabelle 5 zu sehen.

Tabelle 5: Verwendete Konzentrationen für die Kombinationsversuche mit 5 Gy Bestrahlungsdosis und einer Inkubationszeit von 48 und 72 Stunden

Substanz	Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]			
5-Fluoruracil	2,5	10	20	200
Irinotecan	5	25	50	
Oxaliplatin	0,5	2,5	25	

Die Durchflusszytometrie

Ein Durchflusszytometer ermöglicht es, Einzelzellen in hoher Geschwindigkeit quantitativ sowie qualitativ zu charakterisieren. Die zu untersuchenden Zellen werden in eine Trägerlösung aufgenommen und mit hoher Flussgeschwindigkeit durch eine Hochpräzisionsküvette befördert. Die erhöhte Flussgeschwindigkeit und der trichterförmige Aufbau der Zuleitung tragen dazu bei, die Zellen zu vereinzeln [192, 193]. Durch diesen laminaren Flüssigkeitsstrom werden die Zellen von verschiedenen Laserdioden bestrahlt und das dabei reflektierte Licht wird über Detektoren aufgenommen.

Die Streuung des reflektierten Lichts hängt dabei von verschiedenen physikalischen Faktoren wie beispielsweise Zellgröße oder Granularität der Zelle ab. So lässt sich ohne zusätzliche Markierung der Zellen ihre Zellgröße durch die sogenannten Vorwärtslichtstreuung „FCS“ (forward light scatter) und, im rechten Winkel dazu, die Granularität und Membranfaltung im Seitwärtsstreulicht „SSC“ (sideward light scatter) messen.

Zusätzlich können Zellen, die zuvor mit fluoreszierenden Antikörpern bzw. Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, in weiteren Messkammern erfasst werden. Hierbei werden die Zellen von einem Argonlaser mit einer spezifischen Wellenlänge λ angeregt. Deren fluorochrom-abhängige Emission wird dann in Detektoren (z. B. FL1, FL2 und FL3) gemessen.

Tabelle 6: Verwendete Fluorochrome mit entsprechenden Emissionswerte

Fluorochrom	Wellenlängenoptimum	Farbe	Kanal
FITC	520 nm	Grün	FL1
PI	620 nm	Rot	FL2

Die Apoptose Assays

Zur Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate wurde die Annexin V-FITC-Propidiumiodid-Färbung angewandt.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden zwei Formen des Zelltodes unterschieden. Bei der Nekrose, auch „unkoordinierter Zelltod“, führen Noxen direkt oder indirekt zu einer Zellschwellung sowie zur Karyolyse und weiterhin zur Freisetzung von lysosomalen Enzymen, Zytoplasma und zellulären Degradationsprodukten.

Demgegenüber steht die Apoptose, der „programmierte Zelltod“. In der frühen Phase der Apoptose wird Phosphatidylserin auf die Außenseite der intakten Zytoplasmamembran transloziert [194, 195]. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Karyopyknose mit anschließender Karyorrhexis und der Bildung apoptotischer Körperchen, sowie zum Verlust der Membranintegrität.

An Zellen in der früh- aber auch spätapoptotischen Phase kann nun Annexin V (Ca^{2+} -abhängig) spezifisch an Phosphatidylserin binden [196].

Für die Durchflusszytometrie wurde mit FITC-gekoppeltes Annexin V verwendet.

Um Zellen in früh- oder spätaoptotischen Stadien von solchen in nekrotischen unterscheiden zu können, wurde ein weiterer Marker angewandt: Propidiumiodid (PI), ein Fluoreszenzfarbstoff. Dieser kann nur bei Verlust der Membranintegrität in die Zelle eindringen und dort in DNA und RNA interkalieren [197].

Durch die Doppelfärbung konnten nun frühapoptotische Zellen, welche Annexin V positiv und PI negativ waren, von spätaoptotischen Zellen (Annexin V positiv und PI positiv) Zellen unterschieden werden.

Zur Bestimmung der Apoptoseraten wurden die Zellen nach Ablauf der Behandlung für die Quantifizierung vorbereitet. Der Kulturüberstand wurde jeweils in ein Röhrchen überführt. Die adhärenen Zellen wurden, wie bereits beschrieben, mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Die Suspension wurde ebenfalls zu den dazugehörigen Röhrchen gegeben und bei 1.200 upm zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und dem Pellet 100 µl Färbelösung bestehend aus 93 µl Binding Buffer, 2 µl Annexin V-FITC und 5 µl PI dazugegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit im Dunkeln waren die Zellen für die Quantifizierung bereit.

Die Zellzyklusanalysen (Nicoletti-Färbung)

Zur Analyse von Zellzyklusveränderungen wurde nach der Methode von Nicoletti et al. vorgegangen [198]. Die Zellen wurden mit den Substanzen in den verschiedenen Konzentrationen (Tabelle 7) behandelt bzw. mit 5 Gy bestrahlt. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit (0 h, 6 h, 12 h, 24 h 48 h und 72 h) wurde der Kulturüberstand in Zentrifugationsröhrchen gegeben und die Zellen mit Trypsin abgelöst. Nach anschließender Zentrifugation 1.200 upm wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 2 ml -20 °C kaltem 70 %igen Ethanol tröpfchenweise unter ständigem Mischen fixiert und permeabilisiert. Nach einer Mindestinkubationszeit von einer Stunde bei 4 °C wurde die Suspension erneut zentrifugiert und das Pellet zweimal mit 4 °C kalter 2 %iger FBS-Lösung gewaschen.

Im Anschluss daran folgte der RNA-Verdau mittels RNase A in einer Endkonzentration von 1 mg/ml PBS. Hierfür wurde das Pellet mit 150 µl PBS/RNase A Lösung versetzt und bei 37 °C 30 Minuten inkubiert. Durch die Zugabe von RNase konnte die unspezifische Interkalierung von PI an dsRNA unterbunden werden.

Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von weiteren 150 µl PBS/PI-Lösung, wobei die PI-Konzentration bei 50 µg/ml PBS lag. Nach vorsichtigem vortexen und 15-minütiger Inkubation bei 4 °C im Dunkeln erfolgte die Emissionsquantifizierung mittels Durchflusszytometrie.

Die Quantifizierung erfolgte im FL2-Kanal bei 585 nm Wellenlänge. Die Ergebnisse wurden jeweils in einem Dotplot FL-2A gegen FL-2W (zur Diskriminierung von Doubletten) und in einem FL-2A-Histogramm wiedergegeben.

Tabelle 7: Verwendete Konzentrationen für die Zellzyklusanalysen

Substanz	Konzentration
5-Fluoruracil	20 µmol/l
Irinotecan	25 µmol/l
Oxaliplatin	25 µmol/l

Die Viabilitäts- und Zytotoxizitäts-Assays

Eine weitere Methode zur Bestimmung des toxischen Potentials verschiedener Therapeutika gegenüber Tumorzellen ist die Messung der Stoffwechselaktivität mit 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid-Salz, kurz XTT-Assay genannt. Dabei kann XTT, ein Tetrazolring-Molekül, nur in Mitochondrien lebender Zellen von den mitochondrialen Dehydrogenasen in ein orangefarbiges, wasserlösliches Endprodukt, ein Formazan-Molekül, reduziert werden. Die so entstandene Farbe ist direkt proportional zu den metabolisch aktiven Zellen [199].

Die Farbveränderung und somit die Konzentration des Formazan lässt sich photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmen[199].

Die Zellbehandlung erfolgte in 96-Well Platten analog Kapitel: Die Behandlung der Zellen. Das Gesamtvolumen betrug 100 µl. Nach 44- bzw. 68-stündiger Inkubation wurden je Well 50 µl XTT-Reagenz hinzugegeben. Nach 4-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37 °C erfolgte die Messung im Mikroplatten-Reader. Die erste Messung bei einer Wellenlänge von 630 nm diente als Korrekturwert für die Eigenabsorption der Platte und wurde von der zweiten Messung bei Referenzwellenlänge von 490 nm subtrahiert (siehe Formel 6).

$$\text{Spezifische Absorption} = A_{490\text{nm}}(\text{Probe}) - A_{490\text{nm}}(\text{leer}) - A_{630\text{nm}}(\text{Probe})$$

Formel 6: Berechnung der spezifischen Absorption von XTT.

Proteinexpression

Die Untersuchung der Proteinexpression von unterschiedlich behandelten Zellen erfolgte mittels Gelelektrophorese aus Proteinlysaten und anschließendem Immunoblot.

Die Zellbehandlung erfolgte in 75 cm² Kulturflaschen. Um gleiche Bedingungen wie in 6-Well-Platten zu erzeugen, wurden die Zellzahlen der Fläche von 6-Well-Platten angepasst. Hierzu wurden Zellen ausgesät und 24 h im Inkubator bebrütet. Am Folgetag wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt und entsprechend behandelt. Dabei betrug das Endvolumen 10 ml je Flasche.

Die Herstellung der Lysate

Zunächst wurde der Kulturüberstand in Zentrifugationsröhrchen überführt, die adhären Zellen mit Trypsin abgelöst und in die dazugehörigen Röhrchen gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen bei 1.200 upm zentrifugiert. Die Pellets wurden mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in Lysepuffer resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zusammensetzung des hierfür verwendeten Lysepuffer ist in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8: Zusammensetzung des verwendeten Lysepuffers

Substanz	Volumen
Na ₄ P ₂ O ₇ (0,2 mol/l)	5 µl
NaF (0,5 mol/l)	10 µl
Aprotinin	1 µl
β-Glycerolphosphat	50 µl
Leupeptin	1 µl
Pepstatin	1 µl
Pefabloc	1 µl
Phosphatase Inhibitor Cocktail I	10 µl
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	10 µl
Protease Inhibitor Cocktail	10 µl
Ripa Puffer	943 µl

Die Proteinquantifizierung nach Bradford

Damit sich die unterschiedlichen Proteinexpressionen der behandelten Zellen vergleichen lassen können, müssen bei der späteren Gelelektrophorese äquivalente Proteinkonzentrationen aufgetragen werden. Hierfür wurde die Proteinkonzentration der verschiedenen Lysate mit Hilfe der Bradford-Methode kolorimetrisch bestimmt.

Der hierfür verwendeten Farbstoff Coomassie-Brilliantblau geht eine Komplexbindung mit kationischen oder hydrophoben Seitenketten von Proteinen ein. Dabei verändert sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von $A_{465\text{ nm}}$ auf $A_{595\text{ nm}}$ [200]. So lässt sich anhand von Eichkurven der Proteingehalt einer Lösung berechnen. Zunächst wurde aus Rinderalbumin mit bekannter Proteinkonzentration eine Verdünnungsreihe hergestellt. Diese und die Proben mit der unbekanntem Proteinkonzentration wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit der Färbelösung lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde ihre optische Dichte im Photometer bei $A_{595\text{ nm}}$ Wellenlänge gemessen. Vor der eigentlichen Messung wurde eine leere 96-Well-Platte gemessen, dadurch ließ sich die Eigenabsorption der Platte von den Messergebnissen subtrahieren. Aus den Messwerten der Verdünnungsreihe ließ sich nach dem Gesetz von Lambert-Beer (Formel 7 [201]) eine Eichkurve erstellen, mit der sich dann die Proteinkonzentration der Proben mit der Formel 8 berechnen lässt.

$$E = -\lg T = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \times c \times d$$

- E Extinktion
- T Transmission
- I_0 Einfallende Lichtintensität
- I Austretende Lichtintensität
- ε molarer Extinktionskoeffizient [l/mol·cm]
- c Konzentration der Lösung [mol/l]
- d Schichtdicke der Probe [cm]

Formel 7: Das Lambert-Beer'sche Gesetz.

$$\text{Volumen}_{\text{Lysat}} [\mu\text{l}] = \frac{C_{\text{Gesamt}} [\mu\text{g}]}{C_{\text{Bradford-Assay}} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]}$$

Formel 8: Berechnung der Proteinkonzentration einer Probe.

Proteinauftrennung

Die Proteinauftrennung erfolgte mittels der Methode der Gelelektrophorese nach Laemmli [202]. Hierbei wandern die Proteinmoleküle, welche denaturiert und mittels SDS elektrisch vereinheitlicht wurden, in einem diskontinuierlichem Polyacrylamidgel in einem elektrischen Feld ihrer Molekularmasse entsprechend. Kleine Proteine wandern schneller durch das Gel als große Proteine.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Denaturierungslösung

Substanz	Volumen
XT Reducing Agent 20X	5 μl
XT Sample Buffer 4X	25 μl

Insgesamt wurden insgesamt wurden 150 μg Protein je Probe verwendet. In einem ersten Schritt wurden die Lysate denaturiert. Hierfür wurden 70 μl der jeweiligen bereits verdünnten Probe in ein Reaktionsgefäß überführt, mit 30 μl Denaturierungslösung versetzt (siehe Tabelle 9) und fünf Minuten bei 95 °C erhitzt. Zur Trennung unlöslicher Bestandteile wurden die Proben kurz zentrifugiert. Im Anschluss folgte die Beladung des Gels. In das zuvor mit Laufpuffer (siehe Tabelle 10) vorbereitete Gel wurden 35 μl je Probe in eine Tasche pipettiert. Zur Abschätzung der Proteingröße wurde je Gel 15 μl eines Markes (Page Ruler Plus) mit vorgefärbten Proteinen, die ein Molekulargewicht von 10 bis 250 kDa besitzen, mitgeführt. Die Elektrophorese lief bei einer Spannung von 200 V für ca. 40 Minuten.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Laufpuffers

Substanz	Volumen
Deionisiertes Wasser	475 ml
XT MOPS Running Buffer 20X	25 ml

Western Blot

Der spezifische Nachweis der separierten Proteine erfolgte durch die Methode des „Semidry Western Blots“. Hierbei werden die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran transferiert, im Anschluss geblockt und mit spezifischen Primärantikörpern gegen das zu untersuchende Protein inkubiert. In einem zweiten Schritt erfolgt die Zugabe eines mit Lumineszenz-Farbstoff gekoppelten Sekundärantikörpers, dieser bindet mit erhöhter Affinität an den Primärantikörper. Hiermit lässt sich die Nachweisgrenze des gesuchten Proteins erheblich erhöhen. Im Anschluss werden die mit Lumineszenz-Farbstoff gekoppelten Sekundärantikörper mittels des Infrared Imager LI-COR Odyssey[®] der Firma LI-COR Biosciences detektiert.

Für die Durchführung wurde zunächst ein Gelsandwich aufgebaut. In einem ersten Schritt wurden die Schwämme, Filterpapiere und Membran mit Transfer-Puffer (siehe Tabelle 11) getränkt. Der Sandwichaufbau erfolgte im Anschluss. Hierfür wurde auf die Anode zunächst ein Schwamm, drei Lagen Filterpapier, die aktivierte Membran und hierauf das Gel mit wiederum drei Lagen Filterpapier, Schwamm und Kathode gelegt. Beim Anlegen des Gelsandwichs sollten den Transfer behindernde Luftblasen vermieden werden, beispielsweise durch Ausrollen des Sandwichs mit einem Zentrifugationsröhrchen.

Dieser Aufbau wurde anschließend in die Blot-Kammer eingesetzt. Der Transfer erfolgte für 30 Minuten bei 4 °C. Die Spannung lag bei 100 V.

Die Überprüfung des Transfers konnte an dem zur Proteingröße mitgeführten Marker sichergestellt werden, somit wurde eine zusätzliche Färbung mit Ponceau-Rot erspart.

Nach dem bloten wurde die Membran für eine Stunde mit 10 % Magermilch bei Raumtemperatur und ständigem Wippen abgesättigt. Hiermit wurde eine unspezifische Bindung der Antikörper vermieden.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Transferpuffers

Substanz	Volumen
Deionisiertes Wasser	800 ml
Methanol	200 ml
Glycin	14,4 g
Tris	3 g

Tabelle 12: Zusammensetzung des Waschpuffers

Substanz	Volumen
Deionisiertes Wasser	900 ml
PBS 10X	100 ml
Tween 20	2,5 ml

Nach dem Waschen mit Waschpuffer (siehe Tabelle 12) folgte die Inkubation der Membran gegen das zu detektierende Protein mit einem spezifischen Primärantikörper über Nacht bei 4 °C unter ständigem Schwenken. Am Folgetag wurde die Membran nochmals mit Waschpuffer gewaschen, um überschüssige und unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Lumineszenz-Farbstoff-gekoppelten Antikörper richteten sich gegen die verwendeten Primärantikörper (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung
Anti-Mouse IgG	1:10.000
Anti-Rabbit IgG	1:10.000
α -Tubulin	1:1.000
Cleaved Caspase-3	1:1.000

2.3 Statistik

Für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und deren statistischen Absicherung wurden alle Versuche für die Bestimmung der Auswirkung von Polychemo- und Radiotherapie sowie von Kombinationen aus Chemo- und Radiotherapie mindestens drei Mal wiederholt. Sowohl für die Bestimmung der Sensitivität als auch bei den XTT-Assays erfolgte eine relative Auswertung der Ergebnisse. Dazu wurden die Kontrollgruppen als 100 % gesetzt und die Veränderungen relativ zu dieser Kontrollgruppe berechnet. Diese wurden als Mittelwerte und zum Teil mit der Standardabweichung angegeben.

Für die Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde ein T-Test mit $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$ und $p < 0,001$ durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte durch die SPSS[®]-Software der Firma IBM. Die ED₅₀-Konzentrationen mit Regressionskoeffizienten wurden mittels der CompuSyn[®]-Software von Ting-Chao Chou berechnet. Die grafische Aufbereitung wurde mittels Microsoft Excel[®] bewerkstelligt. Die Versuche konnten lediglich zweimal durchgeführt werden, so sind diese Ergebnisse nur als Trend anzusehen und nicht als statistisch fundiert.

3. Ergebnisse

Die Polychemotherapie des (metastasierten) Kolonkarzinoms basiert u. a. auf den Wirkstoffen 5-Fluoruracil, Oxaliplatin und Irinotecan. In lokalisierten Stadien bzw. zur lokalen Symptomkontrolle findet zudem die Radiotherapie ihren Einsatz.

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Frage, ob p53 die Effektivität der etablierten Polychemo- oder Radiotherapie beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden die verwendeten Zelllinien zunächst hinsichtlich ihrer Verdopplungszeiten und lichtmikroskopische Morphologie charakterisiert. Im Anschluss daran erfolgten die vergleichende Untersuchung der Chemo- bzw. Radiosensitivität in isogenen Zellmodellen (HCT116 und RKO), die sich nur im p53 Status (wildtyp vs. *knock-out*) unterscheiden. Zu diesem Zweck wurden Assays zur Messung der Proliferation, Apoptoseinduktion und Zellzyklusanalysen auf zellulärer wie auch auf Proteinebene untersucht.

3.1 Charakterisierung der Zelllinien

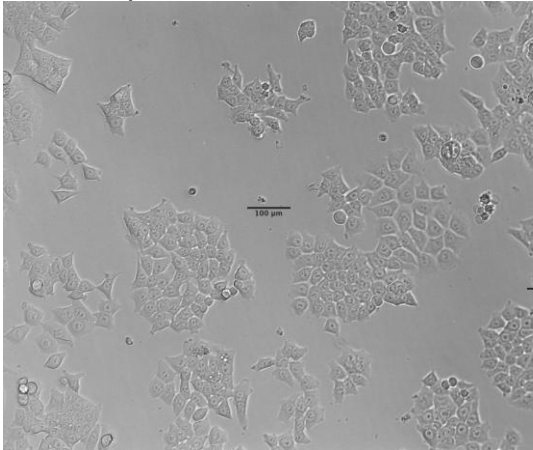
Mikroskopie

Für die bessere Vergleichbarkeit des Therapieansprechens der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien erfolgte zunächst deren Charakterisierung. Die Abbildung 13 zeigt mikroskopische Aufnahmen der verwendeten Zelllinien. Diese Aufnahmen entstanden 72 Stunden nach der Zellaussaat. Die eingesetzten Zellzahlen sind aus Tabelle 15 zu entnehmen.

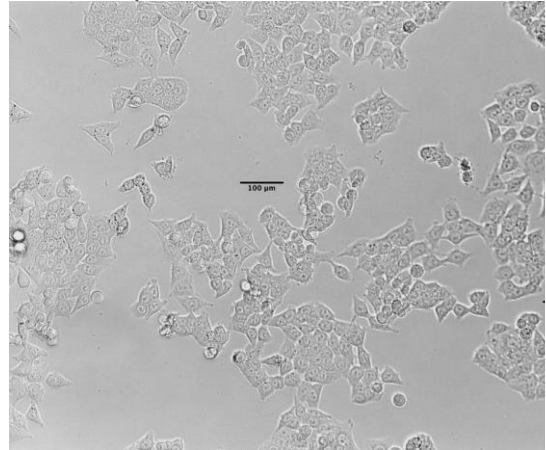
Die Zellen wurden 72 Stunden inkubiert und unter einem Phasenkontrastmikroskop bei 10-facher Vergrößerung nach 12, 48 und 72 Stunden fotografiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellreihen sind alle in der Lage konfluent zu wachsen. Die RKO-Zelllinien bilden meist einen Bilayer aus. DLD-1- und RKO-Zellen sind im direkten Vergleich zu den HCT116-Zellen spindelförmiger. Des Weiteren zeigten die DLD-1-Zellen einen geringeren Kontrast als die RKO- und HCT116-Zellen.

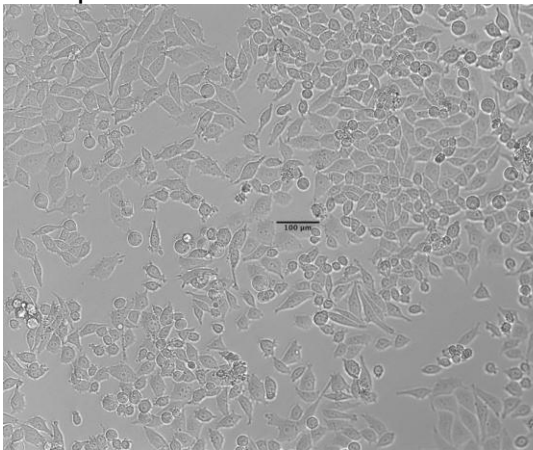
A HCT116 p53 +/+



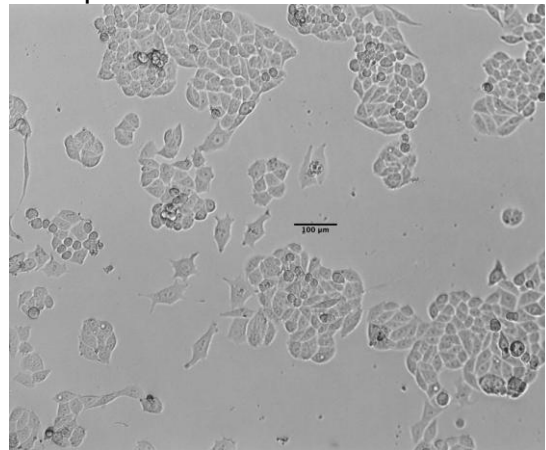
B HCT116 p53 -/-



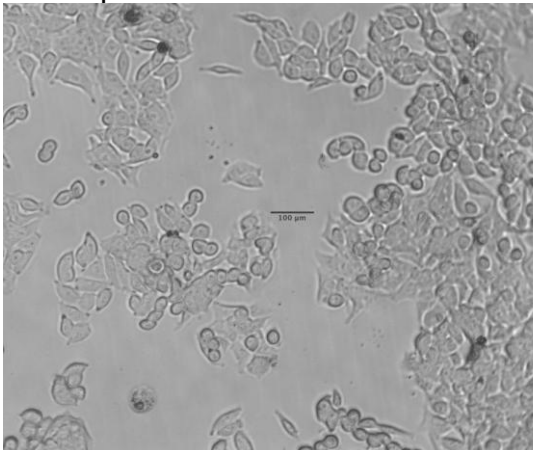
C RKO p53 +/+



D RKO p53 -/-



E DLD-1 p53 +/+



F DLD-1 p53 -/-

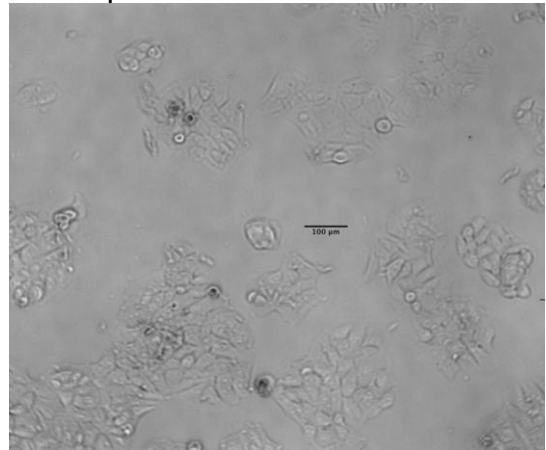


Abbildung 13: Phasenkontrastaufnahmen der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien.

Gezeigt sind Aufnahmen der Zelllinien HCT116 p53 +/+ (**A**), HCT116 p53 -/- (**B**), RKO p53 +/+ (**C**), RKO p53 -/- (**D**), DLD-1 p53 +/+ (**E**) und DLD-1 p53 -/- (**F**). Diese wurden für drei Tage mit nach Tabelle 15 definierten Zellzahlen inkubiert und unter einem Phasenkontrastmikroskop mit 10x Vergrößerung fotografiert.

Verdopplungszeit

Die Zellen wurden mit bekannter Zellzahl (siehe Tabelle 15) in 96-Well-Platten ausgesät und unter einem Invertmikroskop ausgezählt. Im Anschluss erfolgte die Berechnung der Wachstumskonstanten und der Verdopplungszeiten, die berechneten Werte sind Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 14: Berechnete Verdopplungszeiten der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Wachstumskonstante μ [h^{-1}]	Verdopplungszeit t_d [h]
HCT116 p53 +/+	0,0278	24,93
HCT116 p53 -/-	0,0282	24,61
RKO p53 +/+	0,0272	25,53
RKO p53 -/-	0,0277	25,04
DLD-1 p53 +/+	0,0267	25,97
DLD-1 p53 -/-	0,0320	21,68

Die Wachstumskonstanten in den isogenen Gruppen zeigen, dass p53 -/- Zellen eine kürzere Verdopplungszeit haben.

3.2 Sensitivitätsassays

Nach der Charakterisierung der Zelllinien wurde zunächst die Chemosensitivität der einzelnen Zelllinien untersucht. Hierfür wurden die Zellen über 48 Stunden mit 5-Fluoruracil als Vertreter der Inhibitoren des Nukleinsäure-Stoffwechsels, Irinotecan als Topoisomerase-I-Hemmer und Oxaliplatin als Vertreter der Alkylantien inkubiert und anschließend quantifiziert.

Ermittlung der einzusetzenden Zellzahlen

Um mögliche Zelldichteeffekte wie beispielsweise eine Kontaktinhibition zu vermeiden, wurden zunächst die Zelllinien in unterschiedlichen Dichten je in 6-Well und 96-Well-Platten ausgesät und für 48 bzw. 72 Stunden bei optimalen Bedingungen (siehe Methoden) inkubiert.

Im Anschluss wurden die Platten unter einem Invertmikroskop gemustert und eine Konfluenz von ca. 80% angestrebt. Die hierfür einzusetzenden Zellzahlen werden für alle Zelllinien in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 15: Übersicht der eingesetzten Zellzahl für die entsprechende Zelllinie, Plattengröße und Mediumvolumen, die nach 72 h zu einer 80 %igen Konfluenz führten

Zelllinie	Kulturplatte	Wellgröße [cm ²]	Zellzahl	Medium/Well [µl]
HCT116 p53 +/+	6-Well-Platte	9,6	2×10^5	4000
	96-Well-Platte	0,32	5×10^3	100
HCT116 p53 -/-	6-Well-Platte	9,6	2×10^5	4000
	96-Well-Platte	0,32	5×10^3	100
RKO p53 +/+	6-Well-Platte	9,6	2×10^5	4000
	96-Well-Platte	0,32	5×10^3	100
RKO p53 -/-	6-Well-Platte	9,6	2×10^5	4000
	96-Well-Platte	0,32	5×10^3	100
DLD-1 p53 +/+	6-Well-Platte	9,6	2×10^5	4000
	96-Well-Platte	0,32	5×10^3	100
DLD-1 p53 -/-	6-Well-Platte	9,6	$1,6 \times 10^5$	4000
	96-Well-Platte	0,32	3×10^3	100

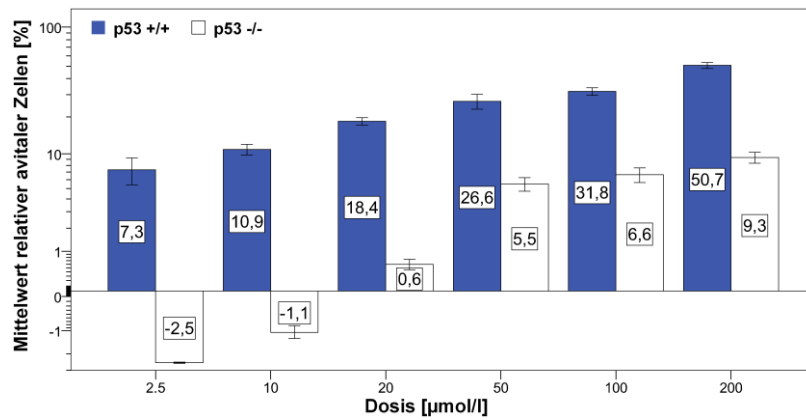
Durchflusszytometrische Messung des Zellüberlebens

Chemotherapeutika

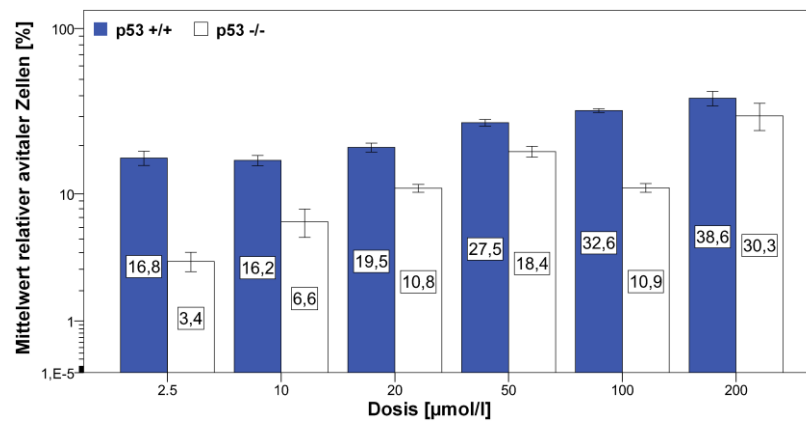
Die Quantifizierung der Chemosensitivität erfolgte durchflusszytometrisch durch Doppelfärbung mit PI und Annexin V-FITC. In den folgenden Abbildungen ist der relative Anteil avitaler Zellen (PI und Annexin V positiv) normiert auf die unbehandelten Kontrollzellen gezeigt.

5-Fluoruracil

A HCT 116



B RKO



C DLD-1

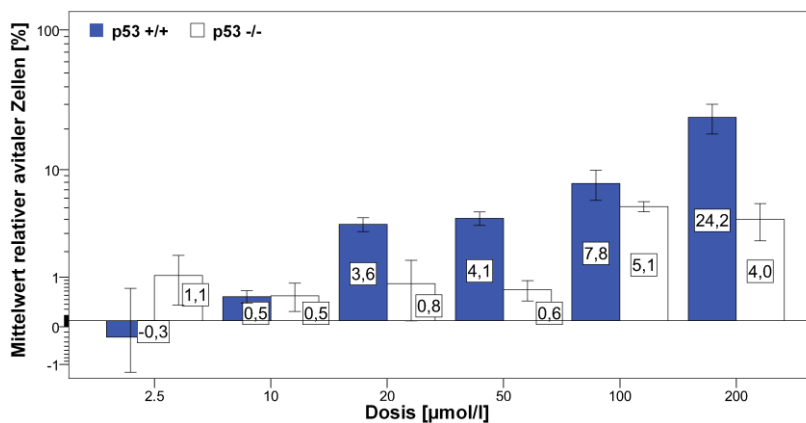
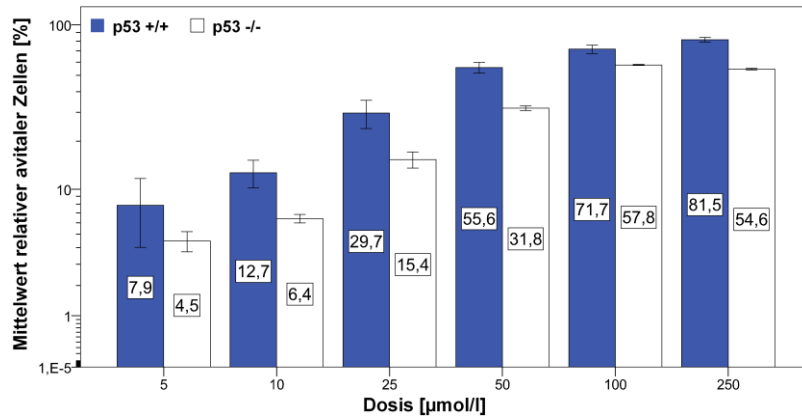


Abbildung 14: Überblickdarstellung avitaler Zellen in Relation zur unbehandelten Kontrollgruppe unter Behandlung mit 5-Fu.

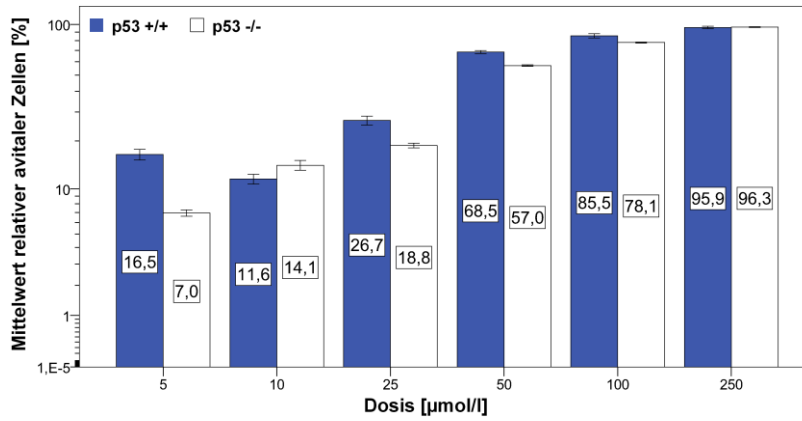
Die Zellen wurden für 48 Stunden mit 5-Fu in entsprechender Konzentration inkubiert. Angegeben sind die Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. Die DMSO-Kontrollgruppe zeigte keine Unterschiede zu der unbehandelten Kontrollgruppe und wurde hier nicht dargestellt.

Irinotecan

A HCT 116



B RKO



C DLD-1

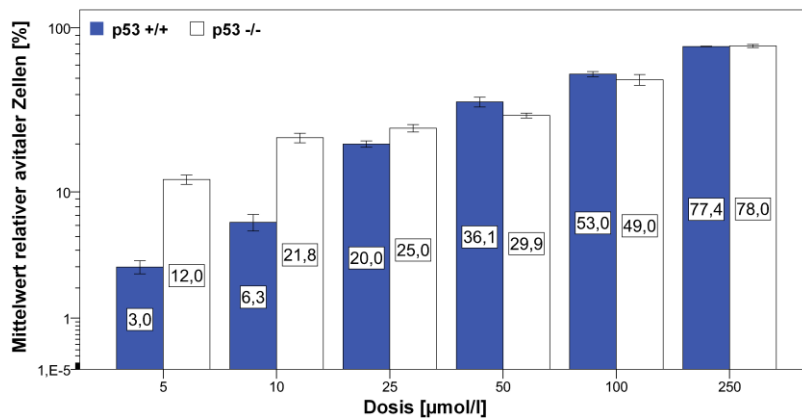
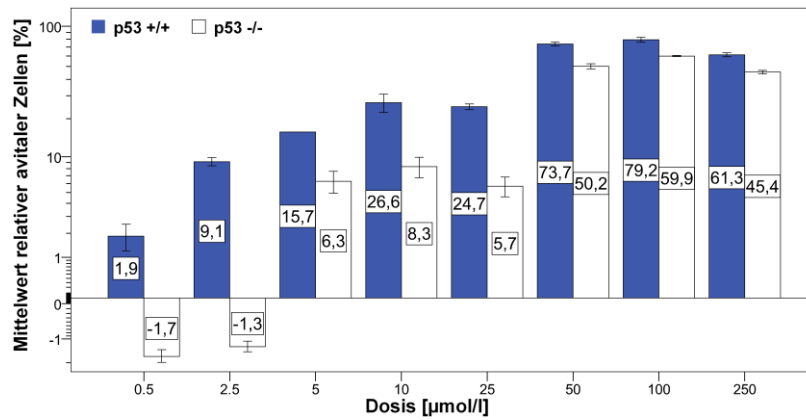


Abbildung 15: Überblickdarstellung avitaler Zellen in Relation zur unbehandelten Kontrollgruppe unter Behandlung mit CPT-11.

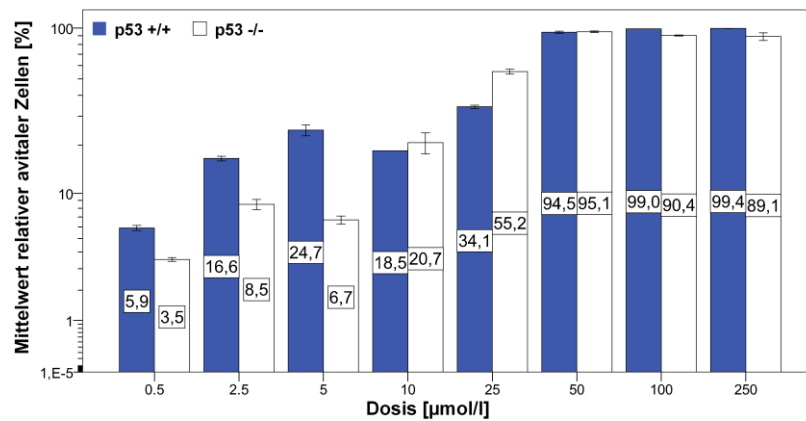
Die Zellen wurden für 48 Stunden mit CPT-11 in entsprechender Konzentration inkubiert. Angegeben sind die Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Oxaliplatin

A HCT 116



B RKO



C DLD-1

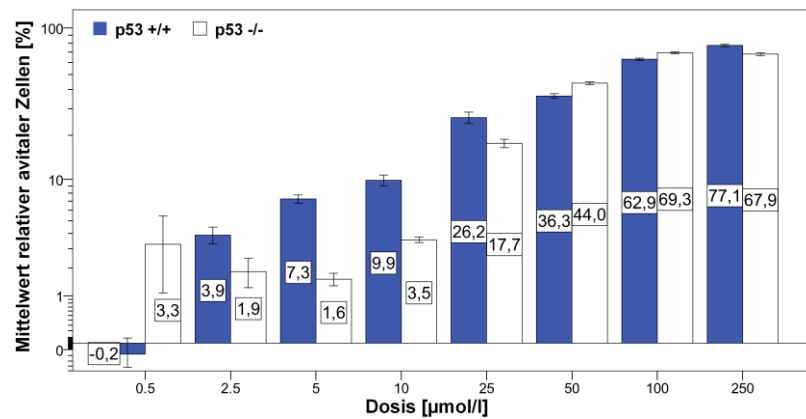


Abbildung 16: Überblickdarstellung avitaler Zellen in Relation zur unbehandelten Kontrollgruppe unter Behandlung mit Oxaliplatin.

Die Zellen wurden für 48 Stunden mit Oxaliplatin in entsprechender Konzentration inkubiert. Angegeben sind die Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Berechnung der ED₅₀ Werte

Aus den in Abbildung 14 bis Abbildung 16 dargestellten Regressionsanalysen wurden zelllinienspezifische ED₅₀ Werte der einzelnen Substanzen berechnet. Diese sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Berechnete ED₅₀ Werte sowie die Regressionskoeffizienten

Zelllinie	Substanz	ED ₅₀ [µmol/l]	Regressionskoeffizient
HCT116 p53 +/+	5-Fluoruracil	237,6	0,98
	Irinotecan	42,7	0,99
	Oxaliplatin	35,5	0,93
HCT116 p53 -/-	5-Fluoruracil	10262,1	0,98
	Irinotecan	120,7	0,97
	Oxaliplatin	133,1	0,91
RKO p53 +/+	5-Fluoruracil	1029,2	0,95
	Irinotecan	26,9	0,96
	Oxaliplatin	7,5	0,92
RKO p53 -/-	5-Fluoruracil	3172,4	0,94
	Irinotecan	34,2	0,97
	Oxaliplatin	11,7	0,88
DLD-1 p53 +/+	5-Fluoruracil	34782,8	0,85
	Irinotecan	74,7	1
	Oxaliplatin	64,5	0,97
DLD-1 p53 -/-	5-Fluoruracil	2,67 x 10 ⁹	0,71
	Irinotecan	74,4	0,91
	Oxaliplatin	106,6	0,89

Die ED₅₀ Werte wurden mit der CompySyn™ Software berechnet. Ein Regressionskoeffizient nahe 1 gibt die Qualität der berechneten ED₅₀ Werte wieder. Am sensitivsten waren die Zelllinien für Oxaliplatin, gefolgt von Irinotecan. 5-Fluoruracil stellte mit z. T. sehr hohen ED₅₀ Werten die Substanz mit der schwächsten Zellsensitivität dar. Der Vergleich der isogenen Zellgruppen zeigt, dass p53 +/+ Zellen wesentlich Sensitiver auf die Chemotherapie reagierten als p53 -/- Zellen.

Bestrahlung

Im Anschluss an die Chemosensitivitäts-Assays wurde die Radiosensitivität der Zelllinien untersucht. Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät (siehe oben), mit einer Dosis von 5 Gy bestrahlt und je 48 und 72 Stunden inkubiert. Im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Quantifizierung.

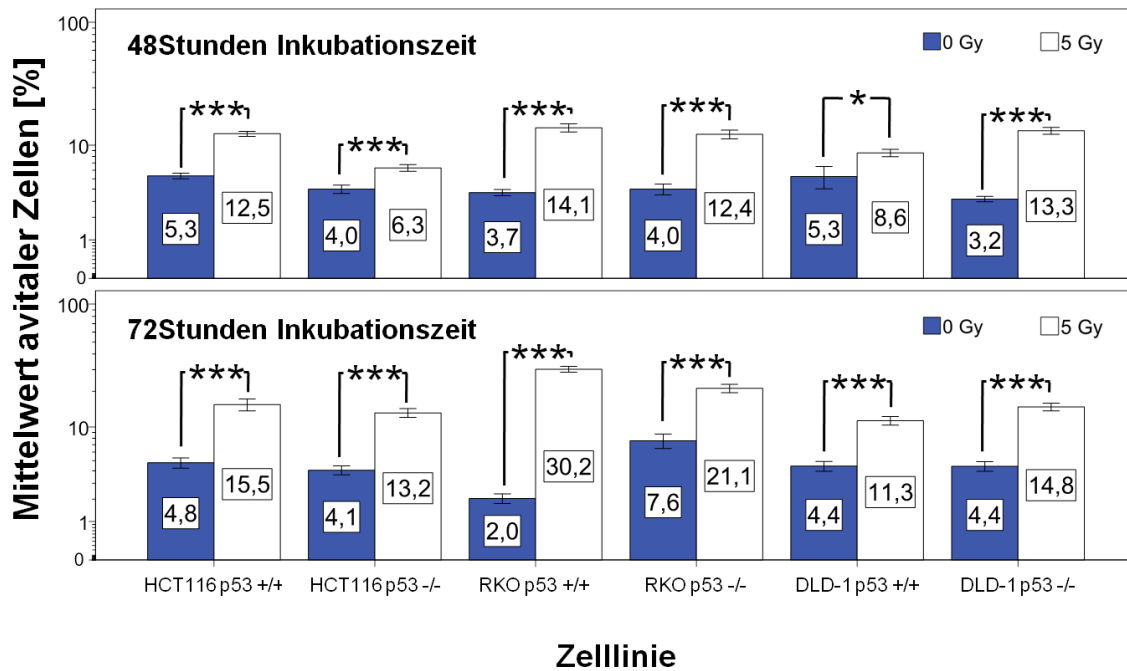


Abbildung 17: Überblickdarstellung avitaler Zellen nach Bestrahlung.

Die Zellen wurden mit einer Dosis von 5 Gy bestrahlt, für 48 bzw. 72 Stunden inkubiert und durchflusszytometrisch quantifiziert. Dabei wurde die Signifikanz der Bestrahlung (weißer Balken) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. Alle Daten mit * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

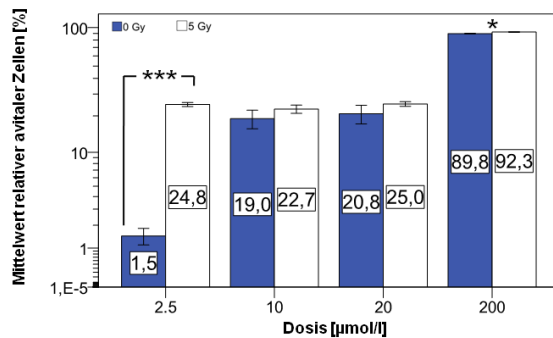
Es zeigte sich sowohl nach 48 als auch nach 72 Stunden nach Radiatio mit 5 Gy in allen Zelllinien eine signifikante Induktion von Apoptose, diese war unabhängig vom p53 Status.

Kombination aus Chemotherapeutika und ionisierender Strahlung

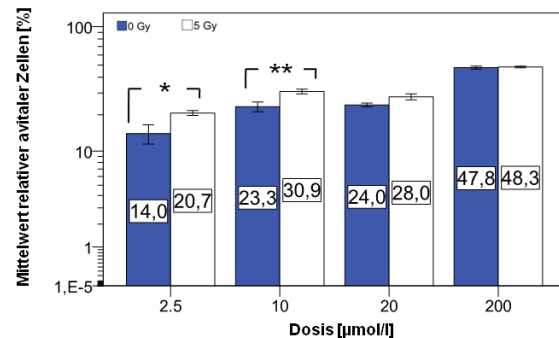
Die Effekte einer kombinierten Behandlung, bestehend aus Bestrahlung und Chemotherapie, wurden ebenfalls untersucht. Die verwendeten Konzentrationen wurden in einem Bereich nahe dem ED₂₅ Wert der HCT116 p53 +/+ Zelllinie gewählt, somit wurde diese Zelllinie als Referenzzelllinie hierfür definiert. Die für die Kombinationsversuche verwendeten Substanzkonzentrationen sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die Bestrahlung erfolgte wieder bei einer Dosis von 5 Gy, die Inkubationszeit lag bei 72 Stunden.

5-Fluoruracil und Radiatio

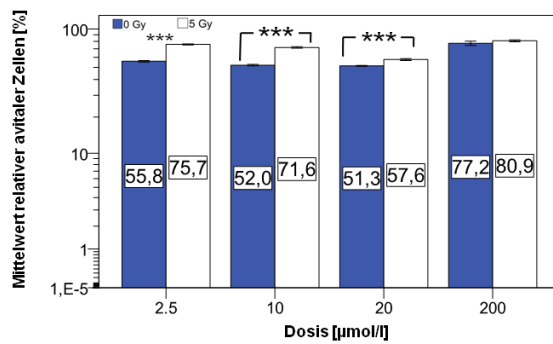
HCT116 p53 +/+



HCT116 p53 -/-



RKO p53 +/+



RKO p53 -/-

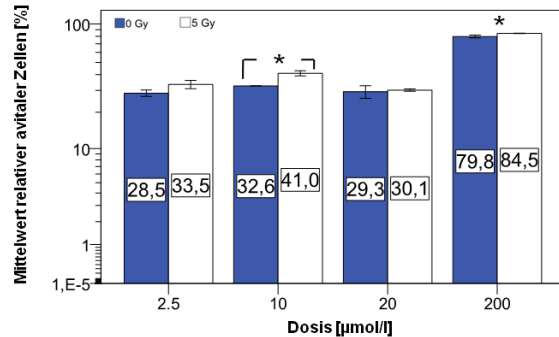


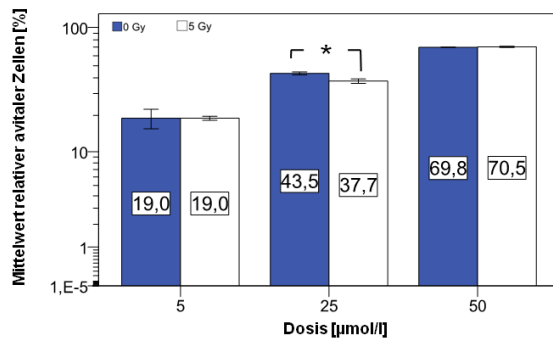
Abbildung 18: Relativer Anteil avitaler Zellen in der Kombinationsbehandlung 5-Fu und 5 Gy.

Die Zellen wurden einer Radiochemotherapie unterzogen und nach einer Inkubationszeit von 72 h durchflusszytometrisch quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

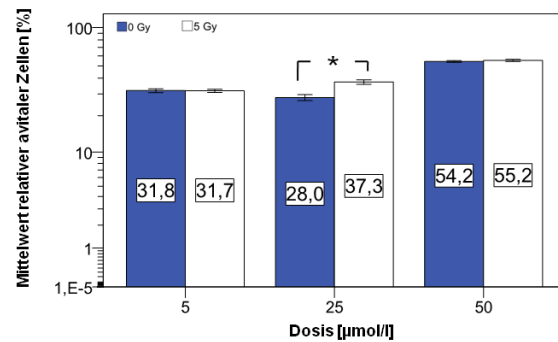
Die Kombination der Radiatio mit 5-Fluoruracil zeigte nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden bei den HCT116 p53 +/+ Zellen nur in den Konzentrationen 2,5 µmol/l und 200 µmol/l statistisch signifikanten Anstiegen avitaler Zellen. Die gleiche Kombination führte bei den HCT116 p53 -/- Zellen nur in den 2,5 µmol/l und 10 µmol/l Konzentrationen zu statistisch signifikant höherer Anteil avitaler Zellen. Bei den RKO p53 +/+ Zellen zeigte die Kombination der Radiatio mit 5-Fu mit Ausnahme der 200 µmol/l Konzentration statistisch signifikanten Anstiegen avitaler Zellen. Während bei den RKO p53 -/- eine statistisch signifikante Erhöhung avitaler Zellen nur in den 10 µmol/l und 200 µmol/l zu beobachten war

Irinotecan und Radiatio

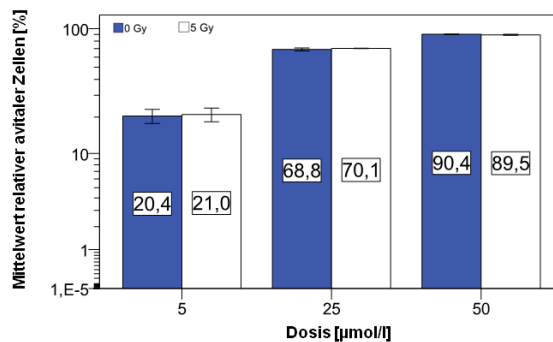
HCT116 p53 +/+



HCT116 p53 -/-



RKO p53 +/+



RKO p53 -/-

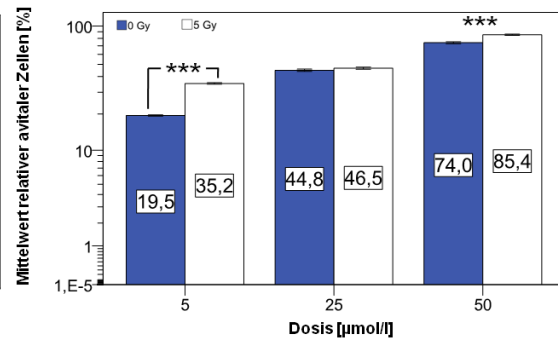


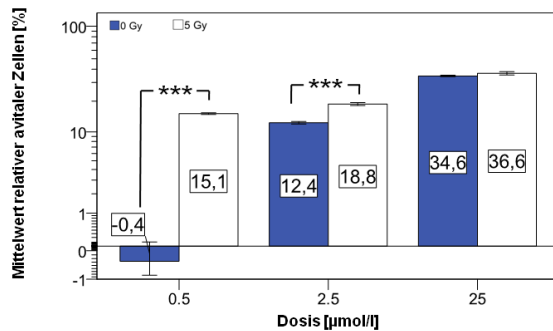
Abbildung 19: Relativer Anteil avitaler Zellen unter der Kombinationsbehandlung CPT-11 und 5 Gy. Die Zellen wurden einer Radiochemotherapie unterzogen und nach entsprechender Inkubationszeit durchflusszytometrisch quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Die Kombinationsbehandlung aus Radiatio und Irinotecan zeigte bei den HCT116 p53 +/+ Zellen nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden keine statistisch relevante ansteige avitaler Zellen. Darüber hinaus konnte in der 25 $\mu\text{mol/l}$ Konzentration ein signifikant vermindertes Ansprechen der Kombination beobachtet werden. Die HCT116 p53 -/- Zellen zeigten nur in der 25 $\mu\text{mol/l}$ Konzentration signifikant höhere avitale Zellen.

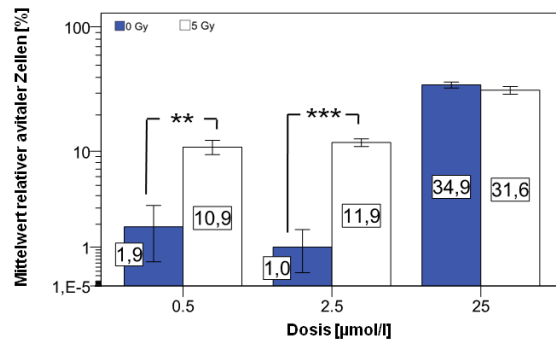
Die selbige Kombinationsbehandlung führte bei den RKO p53 +/+ zu keiner signifikanten Erhöhung avitaler Zellen, dagegen führte die Radiochemotherapie bei den RKO p53 -/- mit Ausnahme der 25 $\mu\text{mol/l}$ Konzentration immer zu signifikante Erhöhungen avitaler Zellen.

Oxaliplatin und Radiatio

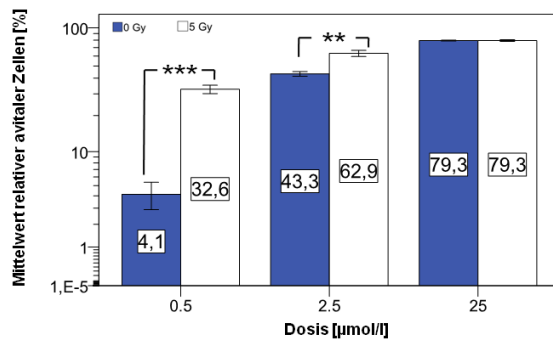
HCT116 p53 +/+



HCT116 p53 -/-



RKO p53 +/+



RKO p53 -/-

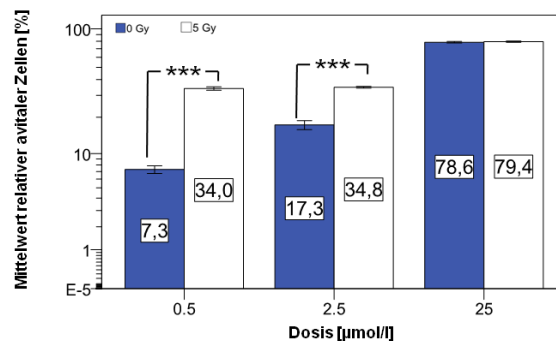


Abbildung 20: Relativer Anteil avitaler Zellen unter der Kombinationsbehandlung mit Oxaliplatin.

Die Zellen wurden einer Radiochemotherapie unterzogen und nach entsprechender Inkubationszeit durchflusszytometrisch quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Die Kombination aus Bestrahlung und Behandlung mit Oxaliplatin der HCT116 p53 +/+ und der HCT116 p53 -/- Zelllinie zeigten mit Ausnahme der 25 µmol/l immer eine statistisch signifikante Erhöhung avitaler Zellen

Gleiches konnte für die Behandlung der RKO Zellen beobachtet werden.

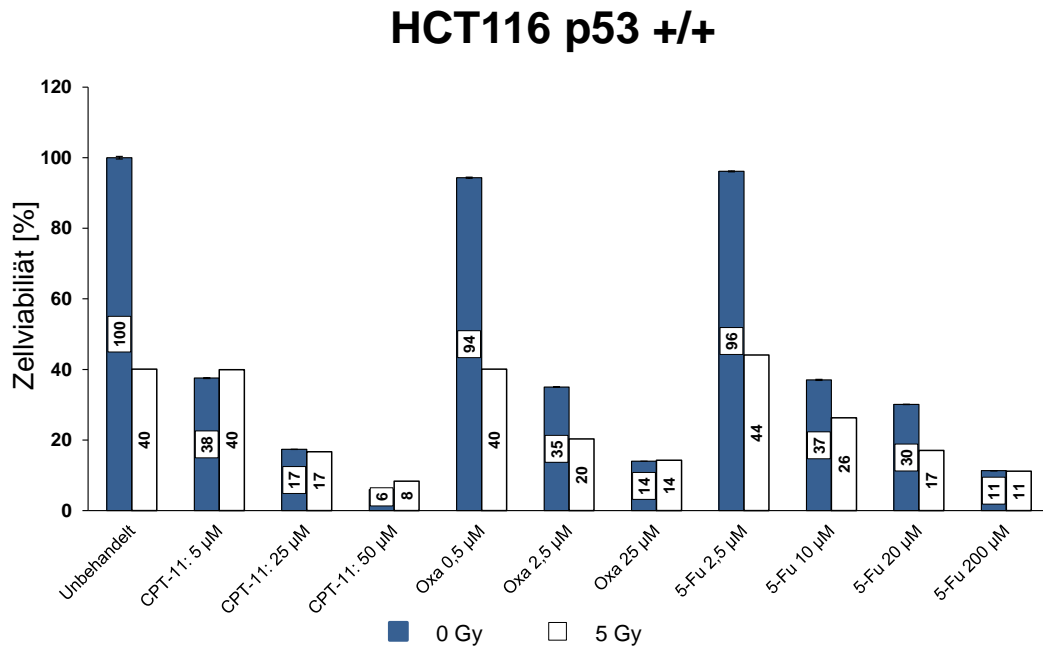
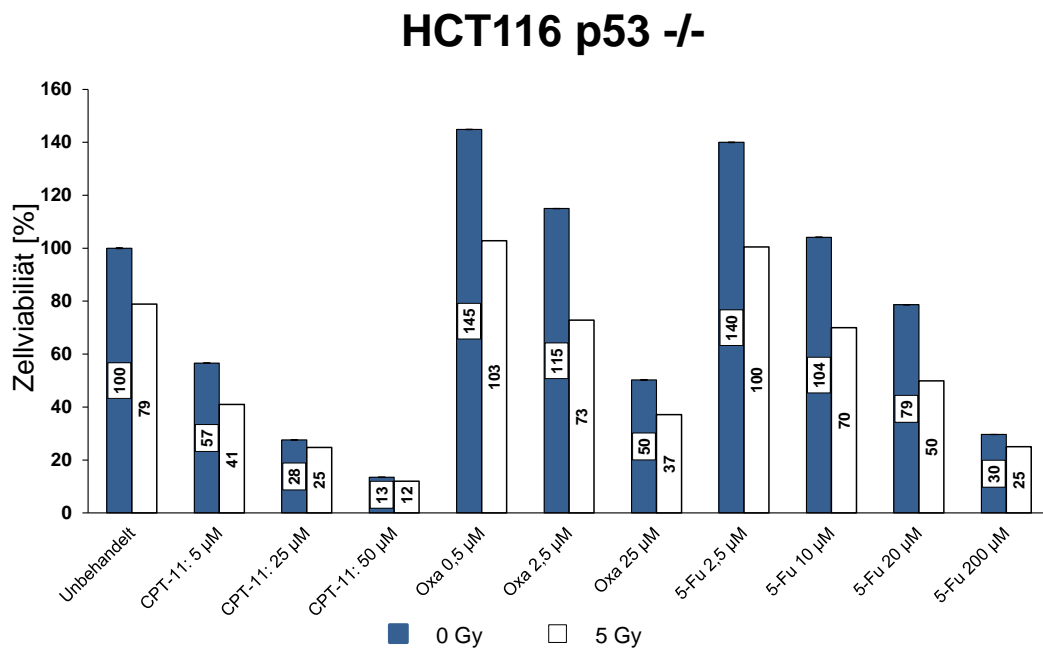
3.3 Proliferationsassay

Ergänzend zu den durchflusszytometrischen Messungen der Sensitivität der Zellen auf die in dieser Arbeit untersuchten Behandlungsmethoden wurden zusätzlich XTT-Proliferationsassays durchgeführt. Die Behandlung erfolgte in 96-Well-Platten, die Inkubationszeiten lag wieder bei 72 Stunden.

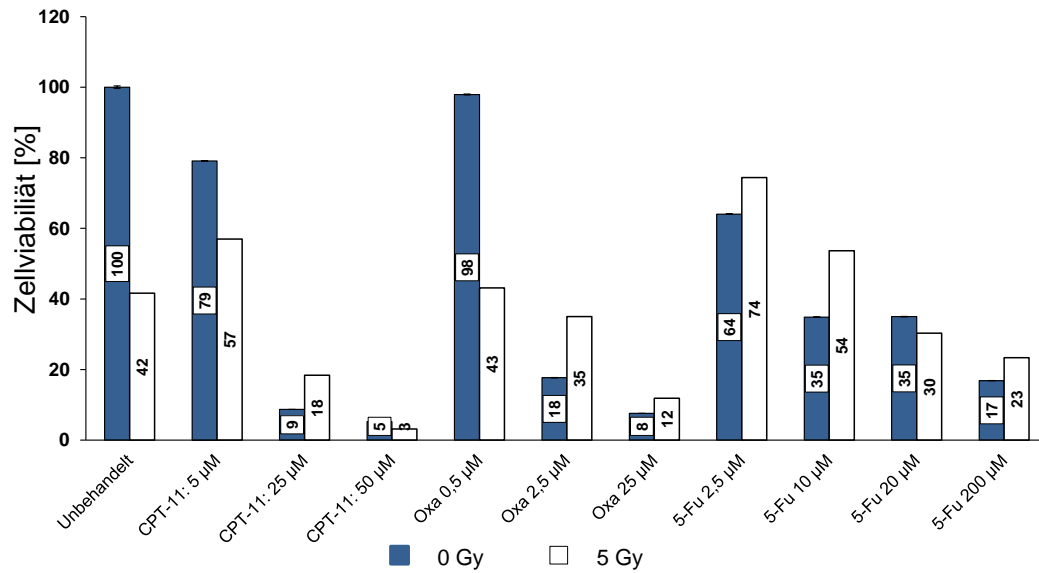
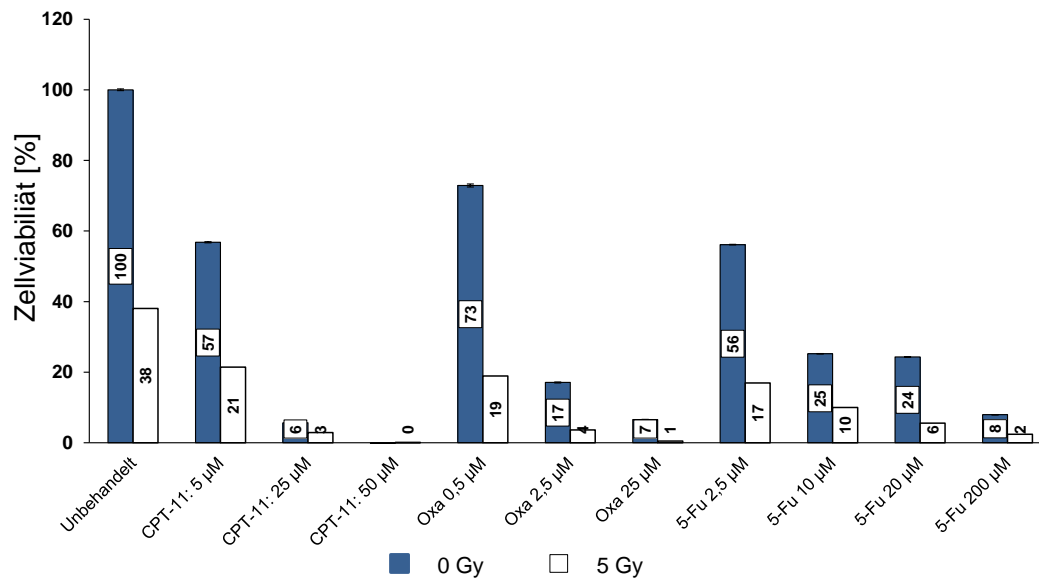
Die Untersuchung HCT116 p53 +/+ Zelllinie zeigte ein Konzentrationsabhängiges Abfallen der Stoffwechselaktivität nach chemotherapeutischer Behandlung. Indessen zeigte die Kombinationsbehandlung mit Irinotecan und ionisierender Strahlung zum Teil höhere Stoffwechselaktivitäten als die alleinige Substanz.

Die HCT116 p53 -/-Zelllinie zeigte in der Untersuchung der Stoffwechselaktivität ein sehr interessantes Verhalten. So lag die Aktivität dieser Zelllinie während der Behandlung mit Oxaliplatin (0,5 $\mu\text{mol/l}$ und 2,5 $\mu\text{mol/l}$) und 5-Fluoruracil wesentlich höher als die der unbehandelten Kontrollgruppe.

Die Kombinationsbehandlungen aller hier getesteten Chemotherapeutika zeigen ein Konzentrationsabhängiges Abfallen der Stoffwechselaktivität.

A**B****Abbildung 21: Darstellung der HTC116 Zellviabilität.**

A zeigt die HCT116 p53 +/+ Zellen nach 72 Stunden Inkubationszeit, **B** HCT116 p53 -/- nach 72 Stunden. Die Zellen wurden entsprechend mit den einzelnen Substanzen inkubiert. Nach adäquater Koinkubation des XTT-Assay, wurde die Extinktion am Elisa gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus mindestens fünf Versuchen.

A**RKO p53 +/+****B****RKO p53 -/-****Abbildung 22: Darstellung der RKO Zellviabilität.**

A zeigt die RKO p53 +/+ Zellen nach 72 Stunden Inkubationzeit, **B** RKO p53 -/- nach 72 Stunden. Die Zellen wurden entsprechend mit den einzelnen Substanzen inkubiert. Nach adäquater Koinkubation des XTT-Assay, wurde die Extinktion am Elisa gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus mindestens fünf Versuchen.

Die Stoffwechselaktivität der RKO p53 +/+Zelllinie fiel stetig mit der Erhöhung der Konzentration der einzelnen Substanzen.

Die Kombinationen der Chemotherapeutika und ionisierender Strahlung zeigten ebenfalls ein Konzentrationsabhängiges Abfallen. Jedoch lagen die Stoffwechselaktivitäten in der Kombination mit 5-Fu höher als bei der Einzelbehandlung. Ähnliches zeigte die Kombination mit Irinotecan und Oxaliplatin.

Die RKO p53 -/- Zellen zeigten ein Konzentrationsabhängiges abfallen der Stoffwechselaktivität. Dies konnte ebenfalls in den Radiochemokombinationen für die verschiedenen Substanzen beobachtet werden.

3.4 Zellzyklusanalysen

Anknüpfend an die Sensitivitäts- und Proliferationsassays wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt. Um die Zellzyklusverteilung der behandelten Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe zu erfassen, wurde eine DNA-Färbung der fixierten und permeabilisierten Zellen mit Propidiumiodid durchgeführt, und diese durchflusszytometrisch quantifiziert. Die Zelllinien wurden entsprechend Tabelle 7 behandelt. Die Fixierung erfolgte nach 0, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden.

Die Behandlung mit 5-Fluoruracil

HCT116 p53 +/-

HCT116 p53 -/-

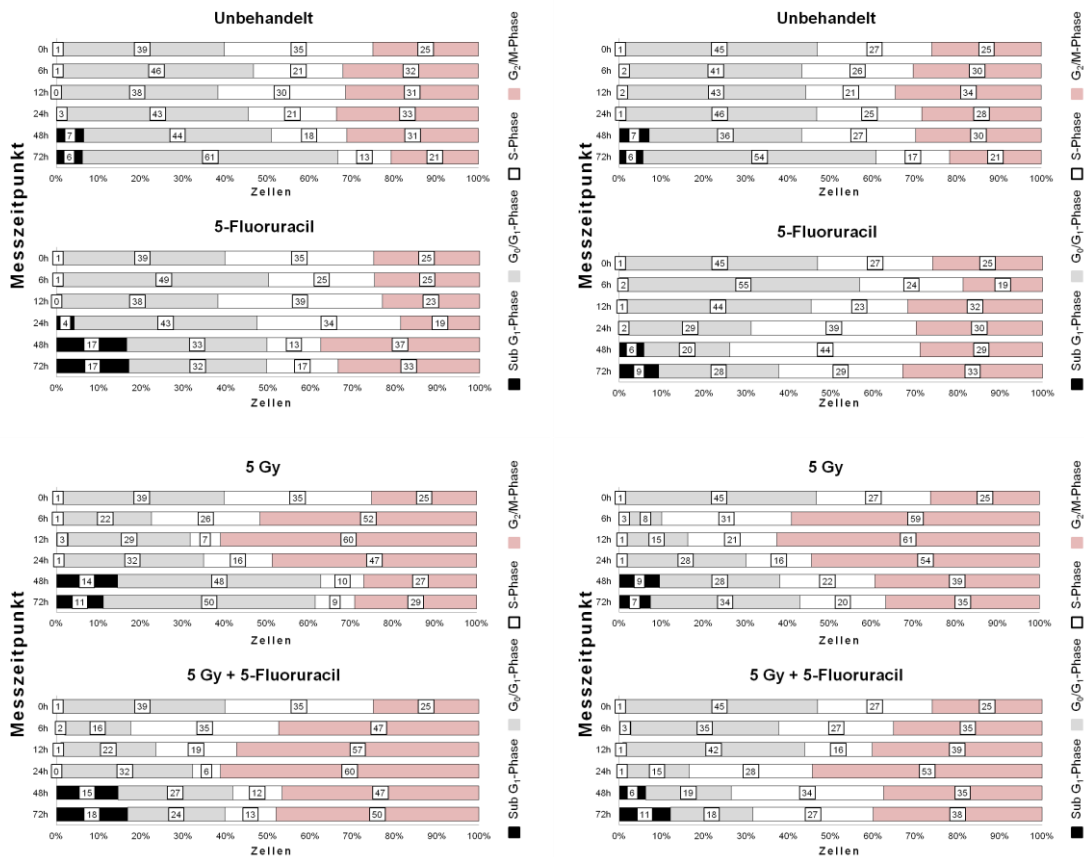


Abbildung 23: Darstellung der Zellzyklusanalysen der HCT116 Zellen.

Die Zellen wurden in einem Zeitraum zwischen 0 und 72 Stunden mit den einzelnen Substanzen inkubiert. Nach der Fixierung und Permeabilisierung erfolgt der RNA-Verdau. Im Anschluss wurde die DNA mittels PI angefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert.

Hierbei zeigte die unbehandelte Kontrollgruppe der HCT116 p53 +/+ Zelllinie in dem hier untersuchten Zeitraum einen stetigen Anstieg der G₀/G₁-Fraktion im Vergleich zum Versuchsbeginn. Des Weiteren kommt es ab 48 Stunden zu einem Anstieg der sub G₁-Fraktion.

Die Behandlung mit 5-Fluoruracil führte zu einem Anstieg der sub G₁-Fraktion bereits 24 Stunden post Behandlung. Des Weiteren kam es zu einem Anstieg der G₂/M-Fraktion. Die Bestrahlung mit 5 Gy führte bei dieser Zelllinie zunächst zu einem Anstieg der G₂/M-Fraktion. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden kam es zu einem Anstieg der sub G₁-Fraktion

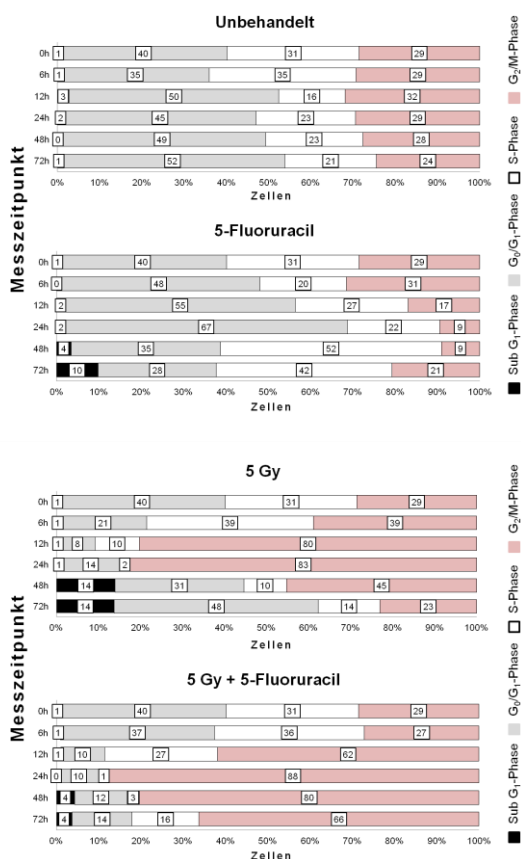
In der Kombination 5-Fu und der Radiatio zeigte einen ähnlichen Anstieg der sub G₁-Fraktion nach 48 Stunden. Darüber hinaus erkennt man einen Anstieg der G₂/M-Fraktion.

Ähnlich verhielten sich die HCT116 p53 -/- Zellen. Hier zeigte die unbehandelte Kontrollgruppe nach 72 Stunden ebenfalls im Vergleich zu Versuchsbeginn einen Anstieg der G₀/G₁-Fraktion. Die sub G₁-Fraktion stieg wieder ab 48 Stunden. Während der Behandlung mit 5-Fu zeigte sich in dieser Zellgruppe ebenfalls ein Anstieg der sub G₁-Fraktion und G₂/M-Fraktion.

Die Bestrahlung zeigte hier erneut einen Anstieg der G₀/G₁-Fraktion. In der 5-Fluoruracil konnte wieder eine Erhöhung der G₂/M-Phase erfasst werden.

Beide hier untersuchten HCT116 Zelllinien zeigten im Vergleich miteinander im Verteilungsmuster der Zellphasen keine Unterschiede.

RKO p53 +/+



RKO p53 -/-

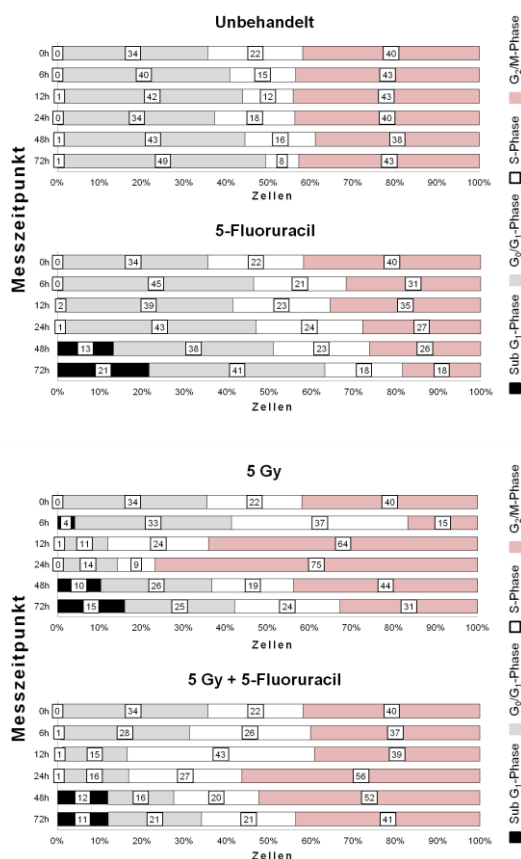


Abbildung 24: Darstellung der Zellzyklusanalysen der RKO Zellen.

Die Zellen wurden in einem Zeitraum zwischen 0 und 72 Stunden mit den einzelnen Substanzen inkubiert. Nach der Fixierung und Permeabilisierung erfolgt der RNA-Verdau. Im Anschluss wurde die DNA mittels PI angefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert.

In der Zellzyklusanalyse der RKO p53 +/+ Zellen wies die unbehandelte Kontrollgruppe nach 72 Stunden einen Anstieg der G₀/G₁Phase auf.

Unter der Behandlung mit 5-Fluoruracil zeigte sich nach 48 Stunden Inkubationszeit der Anstieg der sub G₁-Fraktion, sowie die Abnahme der G₀/G₁- und G₂-Phasen und eine Zunahme der S-Phase.

Nach der Bestrahlung mit 5 Gy zeigten die Zellen ebenfalls eine Zunahme der sub G₁-Fraktion sowie der G₀/G₁-Phase. In der Kombination zeigte sich im Vergleich zu der alleinigen Photonenbestrahlung, ein Anstieg der G₂/M-Phase und die Abnahme der sub G₁-Fraktion.

Die unbehandelte Kontrollgruppe der RKO p53 -/-Zelllinie zeigte nach 72 Stunden einen Anstieg der G₀/G₁-Phase bei gleichbleibender G₂/M-Phase. Die Behandlung mit 5-Fluoruracil führte hier zu einem Anstieg in der G₀/G₁-Phase. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden zeigte sich ein Auftreten der sub G₁-Fraktion.

Die Bestrahlung mit 5 Gy führte wieder nach 48 stündiger Inkubationszeit zu einer sub G₁-Fraktion. Die Kombination führte ebenfalls zu einer sub G₁-Fraktion nach 48 stündiger Inkubation, sowie zu einem Anstieg der G₂/M-Phase

Die Behandlung mit Irinotecan

HCT116 p53 +/-

HCT116 p53 -/-

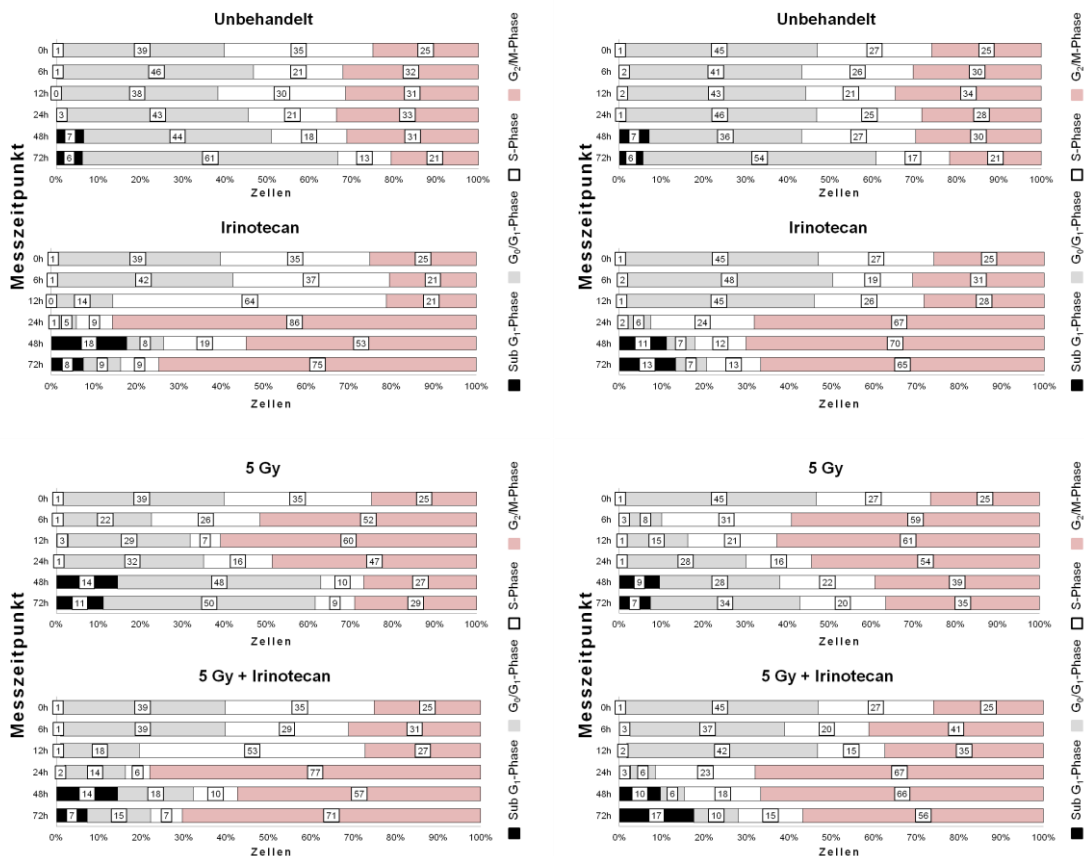


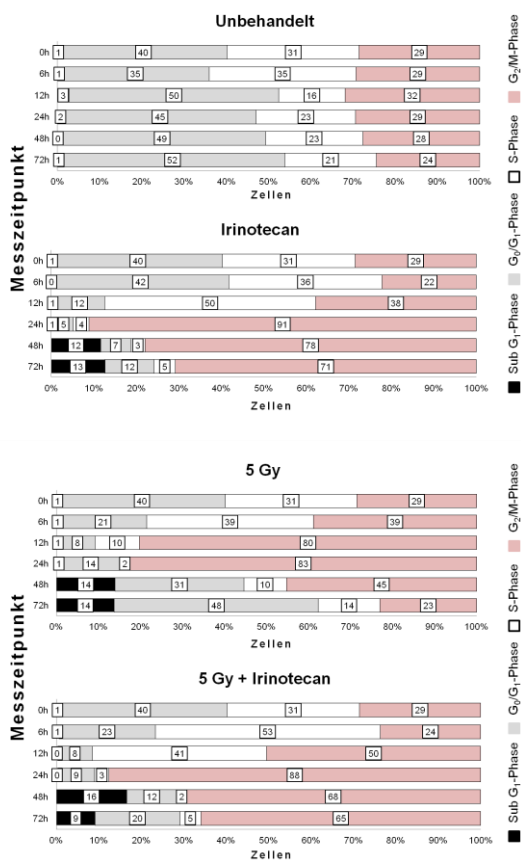
Abbildung 25: Darstellung der Zellzyklusanalysen der HCT116 Zellen.

Die Zellen wurden in einem Zeitraum zwischen 0 und 72 Stunden mit den einzelnen Substanzen inkubiert. Nach der Fixierung und Permeabilisierung erfolgt der RNA-Verdau. Im Anschluss wurde die DNA mittels PI angefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert.

Die Behandlung mit Irinotecan führte bei beiden Zelllinien zu einem massiven Anstieg der G₂/M-Phase. Analog den anderen Behandlungen, kam es nach 48 stündiger Inkubation bei beiden Zelllinien zu einer sub G₁-Fraktion.

Die Kombination mit ionisierender Strahlung zeigte ähnliches. Hier war jedoch die sub G₁-Fraktion bei den HCT116 p536 -/- wesentlich höher im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit Irinotecan.

RKO p53 +/-



RKO p53 -/-

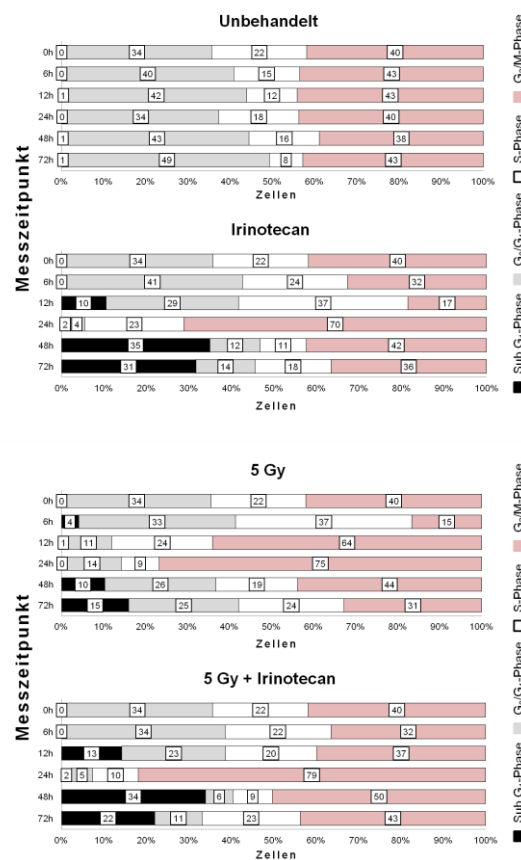


Abbildung 26: Darstellung der Zellzyklusanalysen der RKO Zellen.

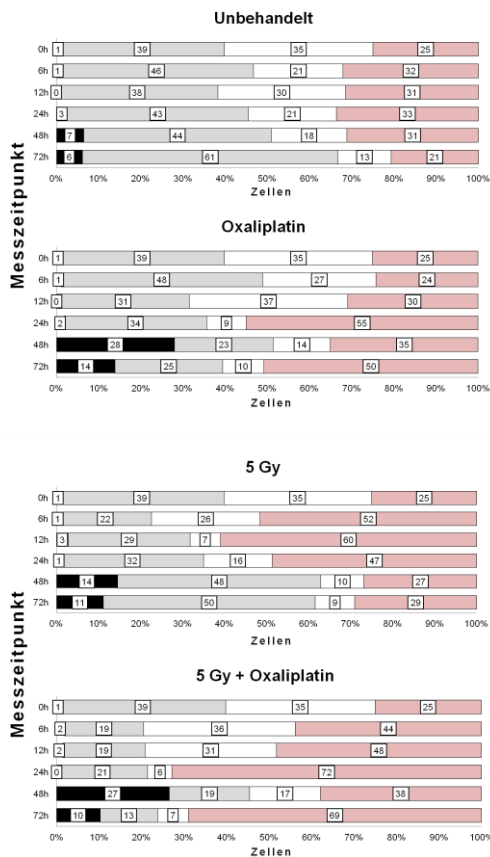
Die Zellen wurden in einem Zeitraum zwischen 0 und 72 Stunden mit den einzelnen Substanzen inkubiert. Nach der Fixierung und Permeabilisierung erfolgt der RNA-Verdau. Im Anschluss wurde die DNA mittels PI angefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert.

Die Behandlung mit Irinotecan führte bei beiden Zelllinien zu einem massiven Anstieg der G₂/M-Phase. Analog den anderen Behandlungen, kam es nach 48 stündiger Inkubation bei beiden Zelllinien zu einer sub G₁-Fraktion.

Die Kombination mit ionisierender Strahlung zeigte wieder bei beiden Zelllinien ein massives Ansteigen der G₂/M-Phase. Des Weiteren erkennt man bei den RKO p53 -/- Zellen eine wesentlich höhere sub G₁-Fraktion als bei den RKO p53 +/- Zellen.

Die Behandlung mit Oxaliplatin

HCT116 p53 +/-



HCT116 p53 -/-

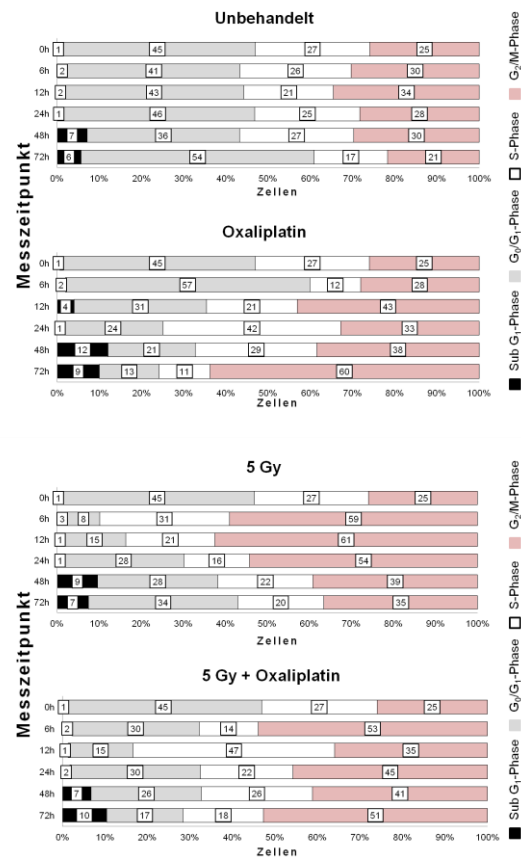
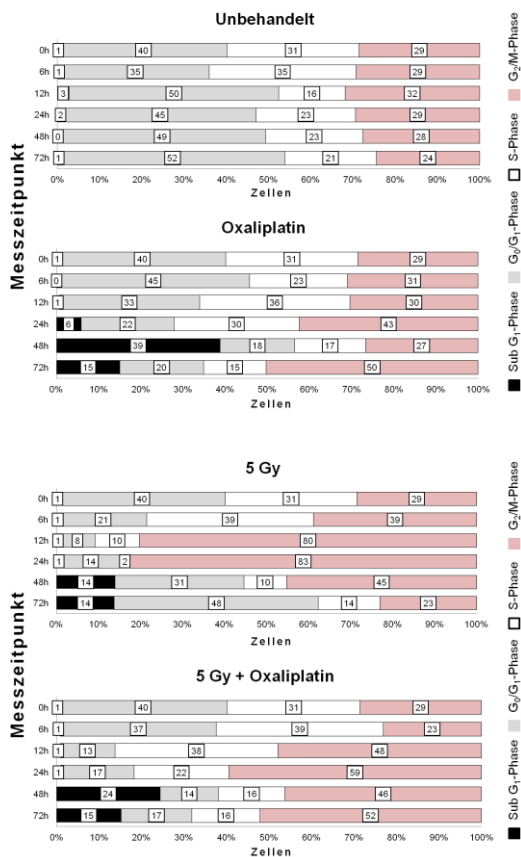


Abbildung 27: Darstellung der Zellzyklusanalysen der HCT116 Zellen.

Die Zellen wurden in einem Zeitraum zwischen 0 und 72 Stunden mit den einzelnen Substanzen inkubiert. Nach der Fixierung und Permeabilisierung erfolgt der RNA-Verdau. Im Anschluss wurde die DNA mittels PI angefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert.

Oxaliplatin löste bei beiden Zelllinien nach 48 stündiger Inkubation eine sub G₁-Fraktion aus. Beide Zelllinien befanden sich nach 72 stündiger Inkubation gehäuft in der G₂/M-Phase. Dies konnte ebenfalls in der Kombination beobachtet werden.

RKO p53 +/-



RKO p53 -/-

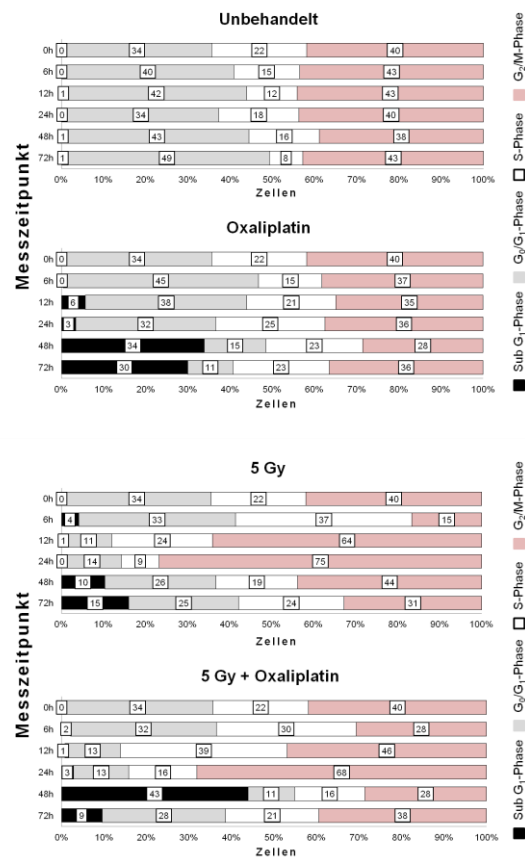


Abbildung 28: Darstellung der Zellzyklusanalysen der RKO Zellen.

Die Zellen wurden in einem Zeitraum zwischen 0 und 72 Stunden mit den einzelnen Substanzen inkubiert. Nach der Fixierung und Permeabilisierung erfolgt der RNA-Verdau. Im Anschluss wurde die DNA mittels PI angefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert.

Die Behandlung mit Oxaliplatin führte bei den RKO p53 -/- Zellen bereits nach 12 Stunden, bei den RKO p53 +/- erst nach 24 Stunden zu einer sub G₁-Fraktion. Die Kombination zeigte wieder einen Anstieg der sub G₁-Fraktion sowie der G₂/M-Phase nach 48 stündiger Inkubation.

3.5 Analysen der Proteinexpression

Parallel zu den durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde die Proteinexpression bestimmt. In den Western Blots wurde untersucht, ob Caspase 3 als bekannter zentraler Apoptosemediator (für ausführliche Darstellung siehe Einleitung) aktiviert wurden. Die Zellen wurden mit den Einzelsubstanzen bzw. in der Kombination behandelt und nach 12 Stunden lysiert.

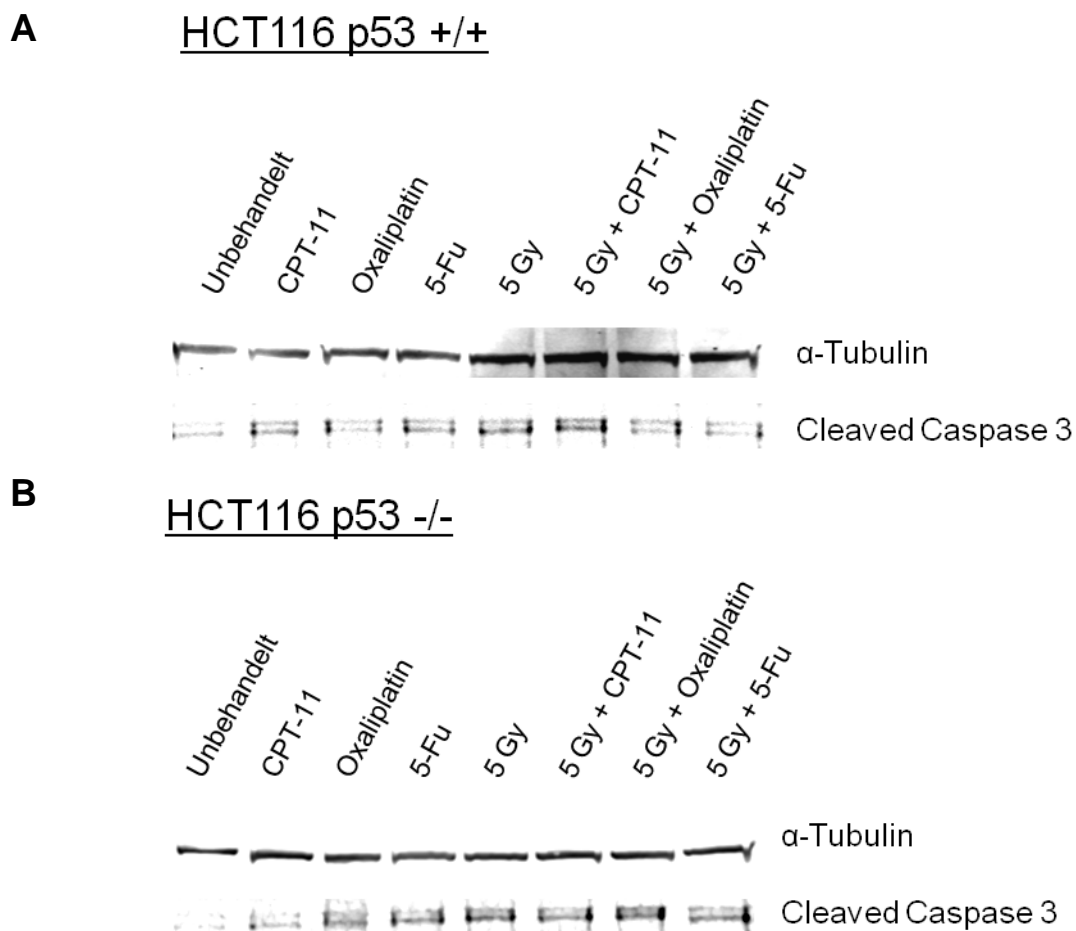


Abbildung 29: Western Blot-Analysen.

A Zeigt die HCT116 p53 +/+ Zelllinie, **B** die HCT116 p53 -/- Zelllinie. Die Zellen wurden in Kulturflaschen behandelt und nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden lysiert.

Die hier untersuchten HCT116 Zelllinien zeigten das Vorhandensein einer Cleaved Caspase 3-Bande bei den unbehandelten Kontrollgruppen (siehe Abbildung 29).

Die Signalintensität zwischen Einzelsubstanz- und Kombinationsbehandlung nimmt bei den p53 $-/-$ Zellen zu, bei den p53 $+/+$ Zellen jedoch nur in Kombination mit CPT-11.

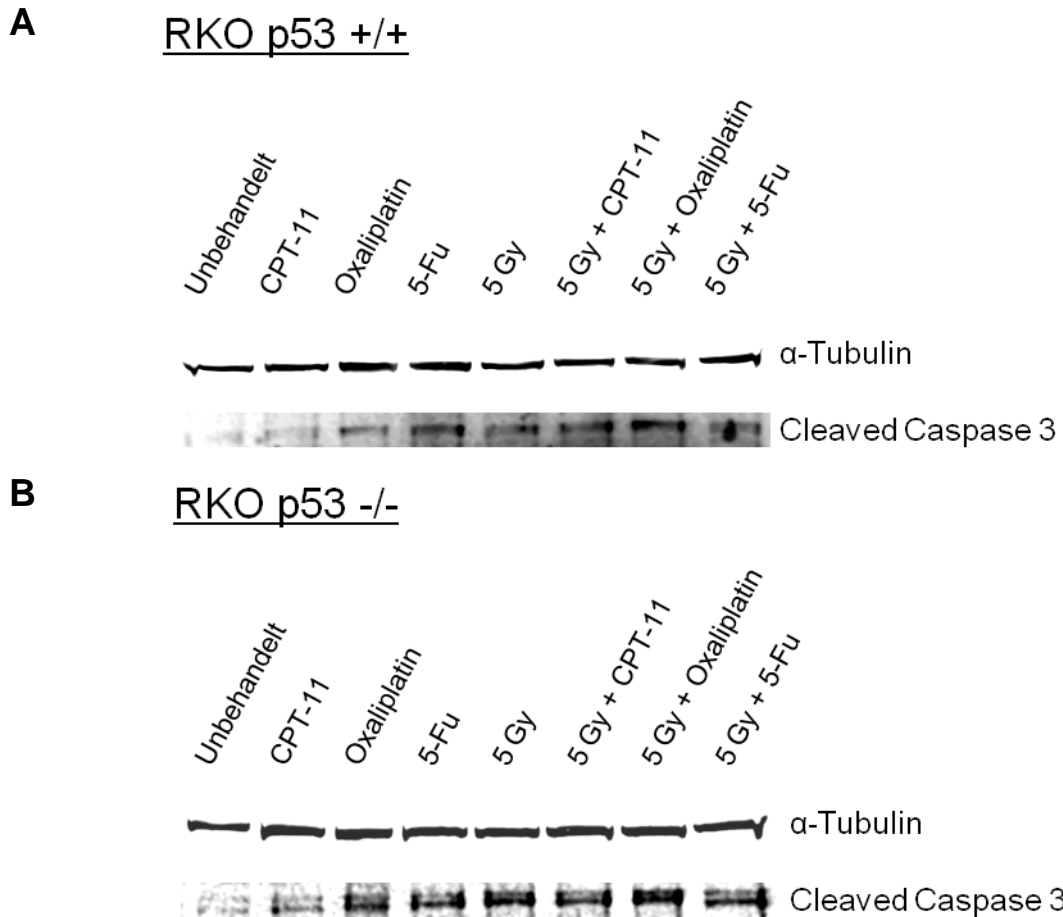


Abbildung 30: Western Blot-Analysen.

A Zeigt die RKO p53 $+/+$ Zelllinie, **B** die RKO p53 $-/-$ Zelllinie. Die Zellen wurden in Kulturflaschen behandelt und nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden lysiert.

RKO-Zelllinien zeigten wie die HCT116 Zelllinie ebenfalls eine *Cleaved* Caspase 3-Bande bei den unbehandelten Kontrollgruppen. Die Signalintensität zwischen Einzelsubstanz- und Kombinationsbehandlung nimmt bei beiden hier untersuchten Zelllinien zu

3.6 Die DLD-1 Zelllinie

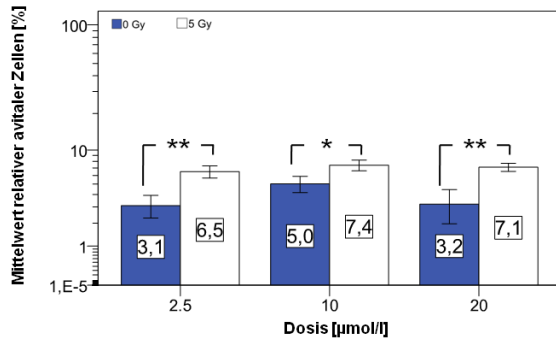
Diese Zelllinie, die aus einem Patienten mit einem klinischen Duke C Stadium isoliert wurde, wurde ergänzend als höhergradiges KRK-Modell herangezogen.

Kombinationsversuche mit ionisierender Strahlung

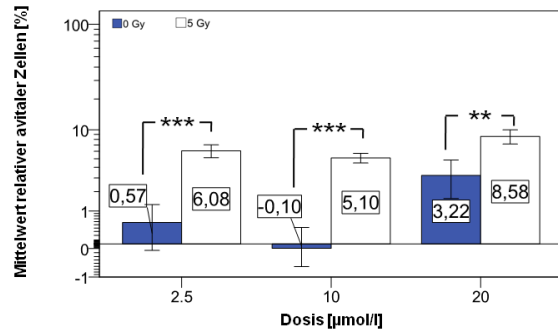
DLD-1 p53 +/-

DLD-1 p53 -/-

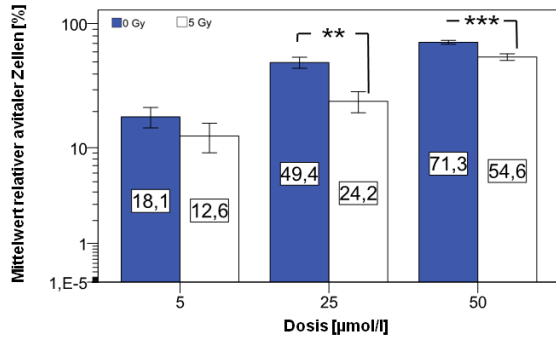
5-Fluoruracil



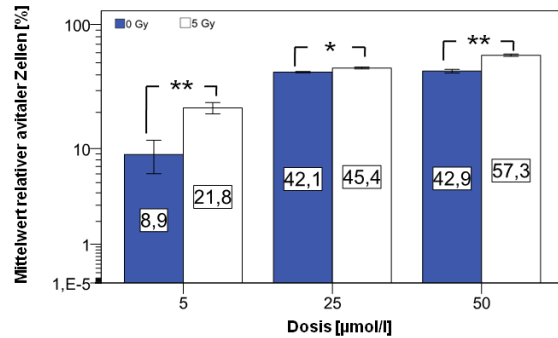
5-Fluoruracil



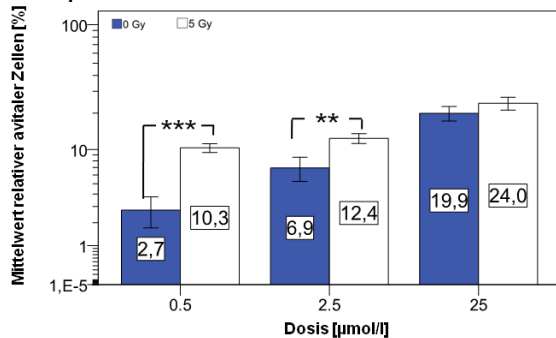
Irinotecan



Irinotecan



Oxaliplatin



Oxaliplatin

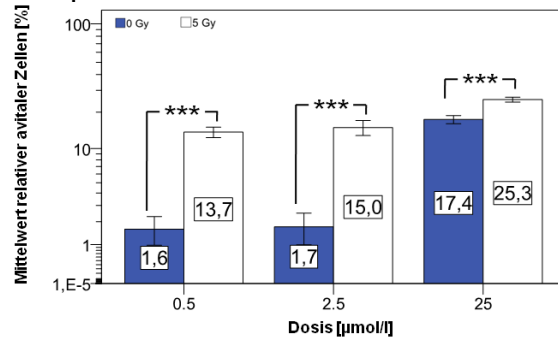


Abbildung 31: Relativer Anteil avitaler Zellen unter der Kombinationsbehandlung.

Die Zellen wurden einer Radiochemotherapie unterzogen und nach entsprechender Inkubationszeit durchflusszytometrisch quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. * p < 0,05; *** p < 0,001.

Die DLD-1 p53 +/+ Zelllinie zeigte in der Kombination mit 5-Fluoruracil einen um 115 % signifikant höheren Anteil avitaler Zellen.

Bei der Kombination mit Irinotecan zeigte sich wieder der Trend, dass diese Behandlung zu geringeren Anteilen avitaler Zellen führt. Dies konnte nach 72 Stunden in den 5 µmol/l und 50 µmol/l Kombinationen als statistisch signifikant bestätigt werden.

In der Kombination mit Oxaliplatin zeigten diese Zellen ebenfalls im allgemeinen eine signifikante Zunahme der avitalen Fraktion, beispielsweise mit Werten um bis zu 105 % in der Kombination mit 0,5 µmol/l Oxaliplatin. Die Ausnahme bildete die 25 µmol/l Dosierung nach 72 Stunden. Hier konnte kein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden.

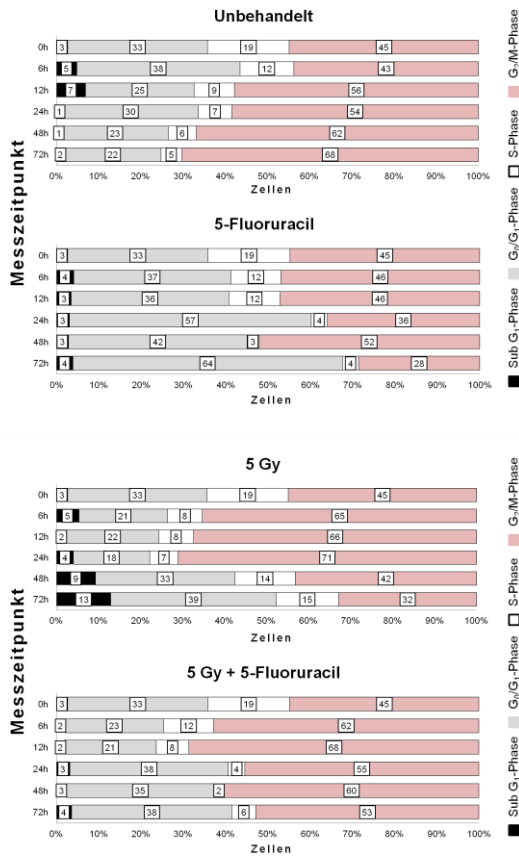
Die DLD-1 p53 -/- Zelllinie zeigten bei der Kombination mit 5-Fluoruracil durchgängig signifikant höhere Anteile avitaler Zellen.

Bei der Kombination mit Irinotecan wies diese Zelllinie wieder durchgängig signifikant höhere Anteile avitaler Zellen auf. Der höchste Anstieg avitaler Zellen war in der Kombination mit 5 µmol/l Irinotecan zu bemerken.

Die Kombination mit Oxaliplatin führte durchgängig zu einem signifikanten Anstieg avitaler Zellen.

Zellzyklusanalysen

DLD-1 p53 +/+



DLD-1 p53 -/-

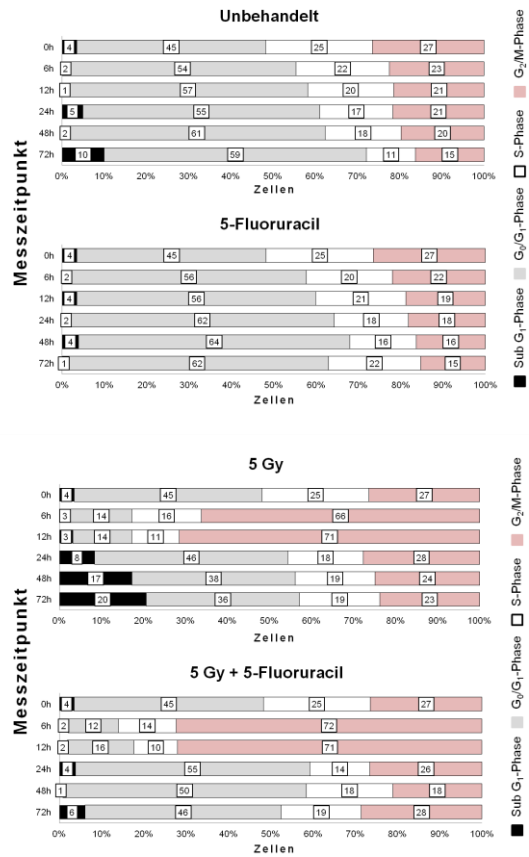
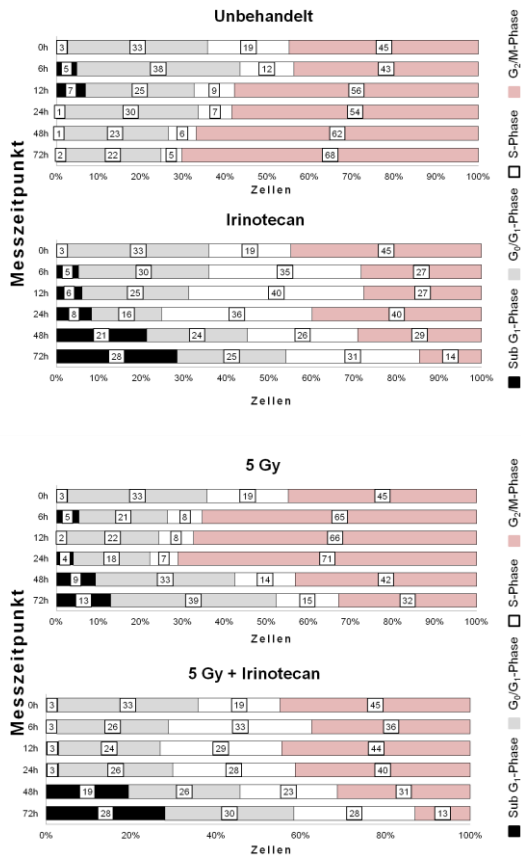


Abbildung 32: Darstellung der Zellzyklusanalysen der DLD-1 Zellen.

Die Zellen wurden in einem Zeitraum zwischen 0 und 72 Stunden mit den einzelnen Substanzen inkubiert. Nach der Fixierung und Permeabilisierung erfolgt der RNA-Verdau. Im Anschluss wurde die DNA mittels PI angefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert.

DLD-1 p53 +/+



DLD-1 p53 -/-

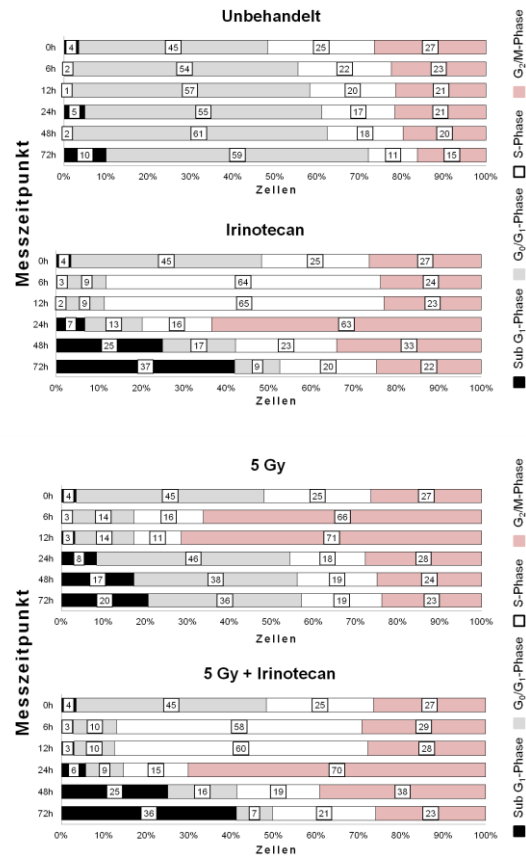
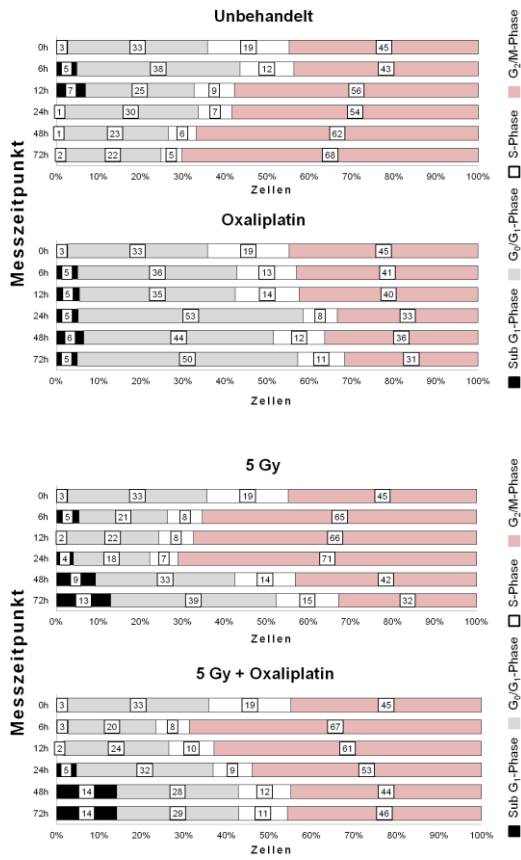


Abbildung 33: Darstellung der Zellzyklusanalysen der DLD-1 Zellen.

Die Zellen wurden in einem Zeitraum zwischen 0 und 72 Stunden mit den einzelnen Substanzen inkubiert. Nach der Fixierung und Permeabilisierung erfolgt der RNA-Verdau. Im Anschluss wurde die DNA mittels PI angefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert.

DLD-1 p53 +/+



DLD-1 p53 -/-

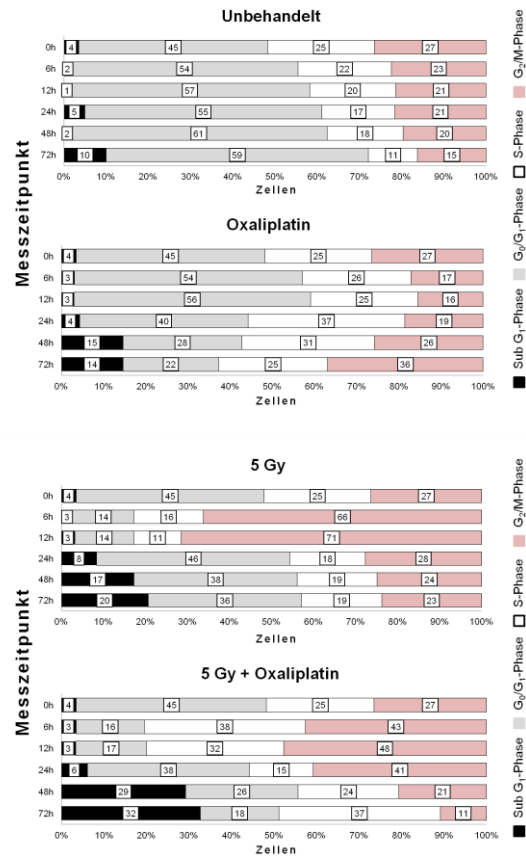


Abbildung 34: Darstellung der Zellzyklusanalysen der DLD-1 Zellen.

Die Zellen wurden in einem Zeitraum zwischen 0 und 72 Stunden mit den einzelnen Substanzen inkubiert. Nach der Fixierung und Permeabilisierung erfolgt der RNA-Verdau. Im Anschluss wurde die DNA mittels PI angefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert.

Die DLD-1 p53 +/+ Zelllinie zeigte in den Analysen des Zellzyklus in der unbehandelten Kontrollgruppe einen stetigen Anstieg der G₂/M-Phase. Während die Behandlung mit 5-Fluoruracil und Oxaliplatin zu einer kontinuierlich starken Zunahme der G₀/G₁-Phase und Abnahme der G₂/M-Phase führte, zeigte die Behandlung mit Irinotecan einen Anstieg der S-Phase. Auf die Bestrahlung mit 5 Gy reagierten die Zellen mit einer Zunahme der G₀/G₁-Phase. Die Kombinationen aus Bestrahlung und 5-Fluoruracil oder Oxaliplatin zeigten jetzt entgegengesetzte Trends in den Zellphasen als noch bei der alleinigen Behandlung mit den Substanzen. Die Kombination aus Bestrahlung und Irinotecan zeigte Parallelen zu den Ergebnissen bei unbestrahlten Zellen, hier stieg die G₀/G₁- und S-Phase-Fraktion an.

Bei der unbehandelten Kontrollgruppe der DLD-1 p53 -/- Zelllinie zeigte sich im hier untersuchten Zeitraum ein stetiger Anstieg der G₀/G₁-Phase. Die Behandlung mit Oxaliplatin und Irinotecan führte hier zu einem Anstieg der G₂/M-Phase. In der Behandlung mit 5-Fluoruracil zeigte sich zu allen Zeitpunkten ein Anstieg der G₀/G₁-Phase.

Nach Bestrahlung mit 5 Gy reagierten die Zellen zunächst mit einem Anstieg der G₂/M-Phase. Dieser war jedoch nach 12 Stunden rückläufig, so dass zum letzten gemessenen Zeitpunkt die Zellen wieder ihre Ursprungsverteilung der Phasen wie zu Beginn der Versuche in der Kontrollgruppe erreichten. Bei der Kombination mit Irinotecan zeigten die Zellen einen massiven Anstieg der S-Phase, die nach 24 Stunden zu einem Anstieg der G₂/M-Phase führte. In der Behandlung mit Oxaliplatin in Kombination mit 5 Gy reagierten die Zellen zunächst mit einem Anstieg der G₂/M-Phase, jedoch war dieser Anstieg rückläufig. So konnte nach 72 Stunden ein massiver Anstieg der S-Phase beobachtet werden. Die Kombinationsbehandlung mit 5-Fluoruracil führte zunächst zu einem starken Anstieg der G₂-Phase. Dieser wurde jedoch nach 24 Stunden von einem Anstieg der G₀/G₁-Phase übertroffen.

4. Diskussion

Trotz enormer Anstrengung in der Krebsvorsorge bleibt das Kolonkarzinom bisher die häufigste geschlechtsunabhängige maligne intraepitheliale Neoplasie des Menschen in Deutschland. Das Erkrankungsrisiko nimmt dabei mit dem Alter stetig zu, was unter Berücksichtigung der aktuellen demographischen Entwicklung einer steigenden Inzidenz gleichbedeutend ist. Die Therapie und somit die Prognose des Kolonkarzinoms haben sich in den vergangenen Jahren zwar verbessert, doch ist die 5-Jahres-Überlebensrate im fortgeschrittenem Stadium der Krankheit kaum größer als 20 % [2]. Während Frühstadien durch chirurgische Intervention gut behandelt werden können, stellen Metastasierungen in späteren Stadien maßgeblich limitierende Faktoren für eine erfolgreiche kurative Behandlung dar.

In lokal oder systemisch fortgeschrittenen Stadien ist die Polychemotherapie ggf. in Kombination mit einer Radiotherapie fester Bestandteil der Therapie. In modernen Therapiekonzepten kommen zudem verschiedene Antikörper gegen EGF oder VEGF Rezeptoren zum Einsatz – wobei hier die Kenntnis des molekulargenetischen Profils des Tumors zwingende Prerequisite für die Therapieentscheidung darstellt: So werden vor dem Einsatz von EGFR Antikörpern heutzutage routinemäßig Untersuchungen auf das Vorliegen von K-RAS bzw. N-RAS und B-RAF Mutationen durchgeführt – da bei positivem Nachweis eine solche Therapie ineffektiv ist [203].

P53 ist ein zentraler Mediator der Apoptoseinduktion, inaktivierende Mutationen in p53 führen zu Therapieresistenz in vielen Tumoren. Die vorliegende Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt den Stellenwert des p53 Status bei der Therapie des KRKs mittels Standardchemotherapie, Strahlentherapie und Kombination derselben zu untersuchen.

Für diese Analysen wurden drei isogene KRK Zellmodelle verwendet, in denen durch genetisches Silencing p53 nicht mehr exprimiert wird.

Diese Zelllinien wurden im Vergleich zur jeweiligen wildtyp Variante hinsichtlich der Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika als auch ionisierender Radiotherapie untersucht. Im Folgenden soll die Durchführung der Versuche bewertet werden und die erhaltenen Ergebnisse in Bezug zur Literatur gesetzt werden.

4.1 Charakterisierung der Zelllinien

In der nativen Lichtmikroskopie konnten zwischen den einzelnen Zelllinien morphologische Unterschiede beobachtet werden. So unterschieden sich die DLD-1-Zellen von den HCT116 und RKO im geringeren Kontrast.

Die Verdopplungszeit der in dieser Arbeit untersuchten kolorektalen Zelllinien unterschied sich kaum innerhalb der einzelnen Zellgruppen und lag bei ca. 23 ± 2 Stunden (siehe Tabelle 14). Dies wurde bereits bei der Etablierung der HCT116 p53 +/+ Zelllinie beobachtet und steht in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit ermittelten Daten [204]. Ähnliche Werte konnten für die RKO p53 +/+ und DLD-1 p53 +/+ Zelllinie in der Literatur gefunden werden [205, 206]. Dabei konnten auch wenn nur marginal, kürzere Verdopplungszeiten für p53 -/- Zellen beobachtet werden. Die p53 Zellfunktionen sind wie bereits in der Einleitung näher erläutert mannigfaltig. Während der Mitose bzw. des Zellzyklus reguliert und kontrolliert p53 als „Gatekeeper“ die Restriktionspunkte. Ein fehlen dieser Funktion kann mit einer Verkürzung der Verdopplungszeit einhergehen. Ähnliches konnte 1993 durch die Autoren Harvey et al. und Tsukada et al. an embryonalen Mausfibroblasten beobachtet werden [207, 208].

Tabelle 17: Charakterisierung der Zellen

Zelllinie	ATCC-Nr.	Organ	Geschlecht	Entität und Stadium
HCT116	CCL-247	Colon ascendens	männlich	Duke A
RKO	DRL-2577	Colon		
DLD-1	CCL-221	Colon	männlich	Adeno-Ca; Duke C

Tabelle 18: Molekulare Charakterisierung der Zellen

Zelllinie	MSI-Status	KRAS	BRAF	PTEN	PIK3CA
HCT116	MSI ¹	G13D	wt	wt	H1047R
RKO	MSI ¹	wt	V600E	wt	H1047R
DLD-1	MSI ¹	G13D	wt	wt	E545K

¹MSI: Mikrosatelliten Instabilität

4.2 Zytotoxische Wirkung der Einzelbehandlungen

5-Fluoruracil

Die durchflusszytometrische Bestimmung des Zellüberlebens erfolgte nach einer Inkubationszeit von 48 bzw. 72 Stunden nach Behandlung. Dabei zeigten erwartungsgemäß alle in dieser Studie verwendeten p53 +/+ Zelllinien unter Behandlung mit 5-Fluoruracil ein besseres Ansprechen auf die Substanz als p53 -/- Zellen. Dies fügt sich in die Beobachtungen weiterer *in vitro* bzw. klinischer Studien anderer Autoren ein [209-212].

Eine mögliche Erklärung für die ausgeprägte p53-Abhängigkeit ergibt sich aus der komplexen Pharmakokinetik von 5-Fluoruracil, welche unter anderem auf einer p53 vermittelten Apoptoseinduktion beruht. Studien anderer Autoren zeigten nach Behandlung mit 5-Fluoruracil zwar keinen Anstieg der p53-mRNA-Konzentration, jedoch eine Gesamtkonzentrationserhöhung von p53 in den Zellen [213]. Dies wurde von den Autoren in erster Linie durch die Aktivität der Thymidylatsynthetase (TS) erklärt. Die TS interagiert u. a. in der translationalen Regulation des p53-Proteins, indem es an die p53-mRNA andockt und damit die Translation von p53 hemmt [214, 215]. Eine Regulation auf RNA-Ebene hat für Zellen im Allgemeinen viele Vorteile. Zum einen können Zellen so auf Noxen sehr schnell reagieren, ohne hierfür die Aktivierung der Transkriptionsmaschinerie in Gang zu setzen. Ein weiterer Vorteil liegt dabei in der Energieeinsparung für die Zelle.

Wird die TS durch 5-Fluoruracil gehemmt, kann die Translation von p53 vonstattengehen und p53 akkumuliert in der Zelle. Je nach Schweregrad der Zellschädigung kann die Zelle nachfolgend in Apoptose oder einen Zellzyklusarrest gehen. Mittels Apoptose werden Zellen welche eine zu starke Schädigung erfahren haben ausgesondert. Zellen im Zellzyklusarrest haben die Möglichkeit die Schädigung zu reparieren. Ist die Schädigung unter 5-Fluoruracil Therapie nun ausreichend groß, wird die p53-vermittelte Apoptose eingeleitet. Dieser Weg des programmierten Zelltodes ist allerdings den p53 +/+ Zellen vorbehalten und kann nicht von den p53-/- *strains* beschritten werden, was wiederum das geringere Ansprechen der p53-/- auf 5-Fu erklärt.

Unabhängig davon können Zellen auch über andere Signalwege eine p53-unabhängige Apoptose einleiten [216]. Dieses, auch als „mitotische Katastrophe“ betitelte Phänomen, kann auf vielen unterschiedlichen Wegen ausgelöst werden. Beispielsweise können Zellen diese während der M-Phase durch Hemmung der Chk2 auslösen [217]. Darüber hinaus können die *Extended family siblings* des p53 (siehe Einleitung) ebenfalls p53 unabhängig die Apoptose auslösen. Die Ergebnisse legen diesen Auslöser der Apoptose für die p53 -/- Zellen bei Behandlung mit 5-Fluoruracil nahe. Es sind jedoch weitere Studien nötig, um dies zu bestätigen.

Obwohl alle in dieser Studie verwendeten p53 +/+ Zellen im Vergleich zu ihren p53 -/- *counterparts* weit sensitiver auf 5-Fu waren, so zeigten sich beim Vergleich der ED₅₀- bzw. der Ansprechkurven doch deutliche Sensitivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien.

Als möglicher Grund hierfür muss die unterschiedliche Herkunft der Zelllinien diskutiert werden. Die Zellen stammen aus humanen KRK unterschiedlicher Individuen in verschiedenen Krankheitsstadien. So stammt die DLD-1 Zelllinie aus einem Patienten im Duke Stadium C [218, 219]. Die Stadien nach Duke beschreiben von A nach D u.a. die Tumorinvasivität und somit die Aggressivität [220]. Duke A ist gleichbedeutend wie ein UICC-Stadium I, d.h. der Tumor infiltriert nicht die Lamina muscularis mucosae.

Ein Duke C bzw. UICC-Stadium III entspricht der regionalen Lymphknoten Metastasierung bzw. regionale Infiltration in umliegende Gewebe [221]. Interessanterweise sind es genau diese Zellen, die sich per se auch im p53 +/- schon sehr viel resistenter gegenüber der Chemotherapie darstellten.

Es ist naheliegend, dass eine erhöhte Toleranz gegenüber 5-Fluoruracil nicht alleinig vom am p53-Status abgeleitet werden kann. Bekanntermaßen unterscheiden sich die hier verwandten Zelllinien in diversen weiteren Merkmalen, wie zum Beispiel dem Vorhandensein weiterer Mutationen wie K-RAS oder B-RAF. So konnten z. B. Houghton et al. und Etienne-Grimaldi et al. beispielsweise einen Zusammenhang zwischen TS und K-RAS-Mutationen ausfindig machen [222, 223].

5-Fluoruracil führt zu einem G₁-Phasen-Arrest in DLD-1 Zellen

Es ist bekannt, dass Karzinomzellen häufig eine verstärkte Aktivität der TS zeigen. So konnten die Autoren Hu et al. erhöhte TS-Konzentrationen in Zellen mit einer schlechteren Prognose bei Pankreaskarzinomen in Verbindung bringen [224]. Des Weiteren spiegelt die TS-Konzentration in der Zelle deren Zellzyklusaktivität wieder: Je höher die Konzentration von TS, desto proliferativer sind die Zellen [225].

Besonders auffällig war dieser Arrest in der DLD-1 Zelllinie. Die Daten zeigen, dass 5-Fluoruracil einen p53-unabhängigen Arrest in der G₁/S-Phase auslöst.

Die Behandlung mit 5-Fluoruracil führte (wie beschrieben) in den in dieser Arbeit verwandten Zellen zu einem Arrest in der G₁/S-Phase. Dieser Arrest war in allen Zelllinien, unabhängig vom p53 Status nachweisbar und lässt somit auf einen p53-unabhängigen Mechanismus schließen. Diese Beobachtungen sind konkordant mit weiteren Literaturdaten [213, 226].

Über welche Signalwege dieser Zellzyklusarrest konkret ausgelöst wird, muss in weiterführenden Studien eruiert werden. Denkbar wäre z.B. eine p53-unabhängige Transkription von p21 durch Aktivierung von Chk2 [227]. Darüber hinaus ist auch eine Beteiligung von Mdm2 (siehe Einleitung), welches ebenfalls in der Lage ist einen p53-unabhängigen G₁-Arrest auszulösen, denkbar.

Irinotecan

Wiederum wurden alle drei Zelllinien im wildtyp und *knock-out* über 48 und 72 Stunden behandelt und anschließend die Apoptoserate nach Annexin V und PI Färbung mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Im Unterschied zu dem Antimetaboliten 5-Fu, ist Irinotecan ein potenter Topoisomerase-I-Hemmer. Die Behandlung führt letztendlich zu einem DNA-Doppelstrangbruch, welcher die Zelle in die Apoptose treibt. Vergleichbar zu den oben diskutierten Daten zu 5-Fu, zeigten die DLD-1 Zelllinien wieder ein interessantes Verhalten. Mit Ausnahme dieser Zelllinie konnte eine p53 Abhängigkeit gezeigt werden. So lagen die ED₅₀-Konzentrationen für die HCT116 p53 +/+ und RKO p53 +/+ Zellen stets unterhalb der der HCT116 p53 -/- und RKO p53 -/- Zellen (siehe Tabelle 16). Die DLD-1 Zelllinien zeigten keine p53 Abhängigkeit, die berechneten ED₅₀-Konzentrationen für diese Zellen waren annähernd gleich und lagen bei 74,4 + 0,3 µmol/l (Regressionskoeffizient bei beiden > 0,9). Ähnliches wird auch von anderen Autoren in *in vitro*- sowie *in vivo*-Studien erfasst [211, 228-231], oder der Effekt wird in den DLD-1 Zellen aufgrund der diversen Entität durch andere Faktoren überlagert.

Es wird allerdings ein anderer interessanter Sachverhalt deutlich: die RKO-Zellen, welche als einzige der hier getesteten Zelllinien keine K-RAS Mutation aufweisen (siehe Tabelle 17) zeigen insgesamt die niedrigsten ED₅₀-Konzentrationen für CPT-11 (siehe Tabelle 16).

Die von Irinotecan ausgelösten DNA-Strangbrüche führen u. a. zu einer Aktivierung von ATM, welches seinerseits zu einer N-terminalen Phosphorylierung von p53 führen kann. Diese wiederum führt zu einer

Erhöhung des p53-Spiegels [78-80]. In der Folge können dann Apoptose oder ein Zellzyklusarrest ausgelöst werden. Jedoch wurden auch p53-unabhängige Apoptoseauslöser beschrieben [232]. Darunter fällt die Aktivierung des p38-MAPK-MK2-Signalweges [233]. Hier ist beispielsweise bekannt, dass JNK direkt die Apoptose auslösen kann. Aoki et al. [234] belegen, dass JNK u.a. die Cytochrom C-Freisetzung in isolierten Mitochondrien, d.h. in einem zellfreien System, auslöst. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, gilt die Cytochrom C-Freisetzung als ein „*point of no return*“ für die Apoptose.

Eine Mutation von RAS führt über eine Entkoppelung der Regulation des MAPK-Signalwegs, zu unkontrollierter Proliferation [184, 185, 187]. Die Tatsache, dass die RKO Zelllinie (ohne K-RAS Mutation) das beste Ansprechen auf Irinotecan zeigt, lässt indirekt Rückschlüsse auf eine Beteiligung des MAPK-Signalweg bei der Apoptoseinduktion zu.

Eine Mutation dieser Kinase ist bei 40 % aller KRKs vorhanden und wird mit schlechterem Ansprechen in Verbindung gebracht [203]. Auch in dieser Arbeit zeigten die beiden Zelllinien mit K-RAS-Mutation ein schlechteres Ansprechen auf die Behandlung mit CPT-11.

Irinotecan führt zu einem G2 Arrest

Im Gegensatz zu 5-Fu führt die Behandlung mit CPT-11 zu einem Zellzyklusarrest in der G₂-Phase. Dies lässt sich über die Wirkungsweise der Topoisomerasehemmer erklären. DNA-Strangbrüche können entstehen, wenn die DNA entspiralisiert wird, wie beispielsweise in sich replizierenden Zellen entstehen, wenn die DNA für die Mitose verdoppelt wird. Die Topoisomerasen vermindern die riesigen Torsionskräfte die auf die DNA wirken. Die Hemmung der Topoisomerase während der DNA-Replikation führt so, zu DNA-Strangbrüchen. Dies kann lediglich (hier am Beispiel) während der Mitose in der S-Phase geschehen.

Kommt es zu einer Schädigung der DNA bzw. zu einem Strangbruch während der S-Phase, so wird der Zellzyklus durch die Chk1 gehemmt. Physiologischer Weise soll die Zelle so die Möglichkeit erhalten, den Fehler zu beheben. Die in dieser Studie durchgeführten Zellzyklusanalysen zeigen, dass die Zellen in einen G₂-Phasen-Arrest übergehen. Dies ist mit der Theorie und mit Publikationen anderer Autoren konkordant [235].

Oxaliplatin

Analog zur oben beschriebenen Behandlung der drei Zelllinien mit 5-Fu und Irinotecan, wurde auch die Behandlung mit Oxaliplatin über 48 und 72h durchgeführt. Dabei sprachen in allen drei Fällen die p53 +/+ Zellen besser auf die Behandlung an, als ihre p53 -/- counterparts.

Oxaliplatin gehört in die Wirkstoffklasse der *Crosslinker*. Die Behandlung mit Oxaliplatin kann zu einer kovalenten Bindung zwischen Platin und den DNA-Basen führen, was wiederum zu einer Quervernetzung der DNA-Stränge führt. Diese kann entweder im gleichen Strang oder aber zwischen zwei Strängen ausgebildet werden.

Wird die DNA vernetzt, so bedeutet dies für die Zelle eine Hemmung der Replikation bzw. der Transkription [236, 237]. *Crosslinker* können durch die Quervernetzung der DNA Strangbrüchen hervorrufen. Dies kann zu einer Aktivierung der ATM führen [238]. Diese Kaskade wurde bereits bei der Behandlung mit CPT-11 genauer beschrieben. Folglich zeigte auch das Therapieansprechen mittels Oxaliplatin Parallelen zu der Behandlung mit CPT-11: die K-RAS-mut-Zellen zeigten wiederum ein schlechteres Ansprechen als die K-RAS-wt Zelllinie RKO. So lagen insgesamt die niedrigsten ED₅₀-Konzentrationen für Oxaliplatin wieder bei den RKO-Zelllinien (siehe Tabelle 16).

Strangbrüche können durch die Aktivierung der ATM, wie bereits beschrieben zu einem G₂-Phasen-Arrest führen. Dies konnte in dieser Studie mit Ausnahme der DLD-1 p53 +/+ Zellen beobachtet werden. Diese Zellen lagen in der G₁-Phase vor. In der Literatur wird beides beschrieben [239, 240].

Der G₁-Arrest bei den DLD-1 p53 +/+ Zellen kann die höhere ED₅₀-Konzentration erklären. Dies kann mit der intakten p53-p21-Kaskade zusammenhängen. Die p21-Kaskade kann zu einem G₁-Phasen-Arrest führen und so der Zelle die Möglichkeit zur Reparatur geben. Es ist bekannt, dass Oxaliplatin bei p53 +/+ Zellen über p21 zu einem G₁-Phasen-Arrest führt [241].

Ionisierende Strahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mittels einer Energiedosis von 5 Gy an einem Linearbeschleuniger. Die Effekte Ionisierender Strahlung auf die DNA sind mannigfaltig. Sie kann zu Einzel- oder Doppelstrangbrüchen, Basenschäden, Quervernetzungen oder zu Mehrfachschäden (sog. „*Bulky lesions*“) der DNA führen [126, 242]. Aufgrund dieser strahlenbiologischen Wirkung sind sich replizierende Zellen bzw. die Transkription betroffen. Im Einklang mit Lee et al. und Fei et al. weisen auch die von uns erhobenen Daten auf ein besseres Ansprechen der jeweiligen p53 +/+ Zellen hin [243, 244]. Die Ausnahme bilden hier die DLD-1 p53 -/- Zellen die entgegen aller Erwartungen sensibler auf IR reagierten als die p53 +/+ Zellen.

Eine Erklärung hierfür liegt möglicherweise in der Art und Weise wie Bestrahlung zur Schädigung von Zellen führt. Die IR führt über DNA-Läsionen letztendlich zu einer Aktivierung von Sensorproteinen, welche in der Lage sind, ATM zu phosphorylieren. ATM wiederum kann sowohl p53-abhängige sowie p53-unabhängige Zelleffekte auslösen.

Ionisierende Strahlung löst einen G₁-Phasen-Arrest in p53 +/+ Zellen aus

Die Daten dieser Studie belegen, dass IR in p53 +/+ Zellen einen Zellzyklusarrest in der G₁-Phase auslösen kann. Nach Aktivierung der Sensorproteine durch die IR wird ATM phosphoryliert. Im Folgenden werden die Effektorinasen Chk1 und Chk2 aktiviert, welche wiederum über p53 zum Zellzyklusarrest führen. Wie el-Deiry et al. zeigen konnten transaktiviert p53 auf diesem Weg die p21-Signalkaskade, was letztendlich zum G₁-Arrest führt [59].

Dieser Signalweg steht den p53 -/- Zellen nicht zur Verfügung und erwartungsgemäß zeigt sich für die p53 -/- Zellmodelle eine Ansammlung der Zellen in der G₂-Phase des Zellzyklus. Dies lässt sich gut mit der direkten Aktivierung von ATM erklären.

Die Viabilitäts- und Zytotoxizitäts-Assays

Die Funktionsweise des XTT-Assays stellt zusammengefasst die mitochondriale Aktivität dar (siehe Methoden). Analog zur oben beschriebenen Behandlungen erfolgte nach einer Gesamtinkubationszeit von 72 Stunden die Messung der Viabilitätsassays. Diese zeigten erwartungsgemäß den konzentrationsabhängigen Abfall des Zellstoffwechsels. Dieser Abfall lässt sich gut mit der noch lebenden Zellzahl bzw. mit der eingeleiteten Apoptose erklären und ist konkordant mit den vorherigen Ergebnissen. Jedoch lassen sich diese Ergebnisse nicht mit den absoluten Zahlen aus den durchflusszytometrischen Untersuchungen gleichstellen. Dies kann an der Diversität der verschiedenen Assays liegen (siehe Methoden).

Die meisten Stoffwechselfvorgänge in der Zelle benötigen ATP als Energieträger. Die Reparaturmechanismen der Zelle sind sehr energieaufwendig. So konnten die Autoren Marcussen und Larsen die Veränderung der ATP-Konzentration während des Zellzyklus charakterisieren und zeigen, dass die zytoplasmatische ATP-Konzentration in der G₂-Phase am höchsten ist [245]. Vergleicht man die XTT-Assays mit den Zellzyklusanalysen, so kommt man zu ähnlichen Schlüssen.

4.3 Die Radio- Chemokombinationbehandlung

Die klinische Behandlung des KRK beruht u.a. auf einer kombinierten Radiochemotherapie. Hierbei werden die Patienten über einen festgelegten Zeitraum mit bestimmten Kombinationen aus Chemotherapeutika und Radiotherapie behandelt. In dieser Studie wurden einige dieser Kombinationen *in vitro* nachgestellt. Hauptaugenmerk wurde dabei auf den Vergleich der Sensitivitäten zwischen p53 +/+ und p53 -/- Zellen bei der Kombinationsbehandlung von Bestrahlung mit jeweils 5-Fluoruracil, CPT-11 und Oxaliplatin gelegt.

Die p53 -/- Zellen profitieren von der Kombinationsbehandlung

Aus den Daten der Durchflusszytometrie und den Proteinexpressionen ist ersichtlich, dass p53 -/- Zellen generell von einer Kombinationsbehandlung profitieren. So konnte bei allen Kombinationen, welche hier getestet wurden, stets ein Anstieg der Sensitivität beobachtet werden. Dabei war der höchste Anstieg der Sensitivität gegenüber der Kombination von Bestrahlung und 5-Fluoruracil bei den DLD-1 p53 -/- Zellen zu beobachten. Der Anstieg avitaler Zellen in der Radiochemotherapie gegenüber der chemotherapeutischen Einzelbehandlung sind in der nachfolgenden Tabelle (siehe Tabelle 19) zusammengefasst.

Tabelle 19: Prozentuale Veränderung der Anteile avitaler Zellen während der Kombinationsbehandlungen im Vergleich zu der chemotherapeutischen Einzelbehandlung

Kombination	Z e l l i n i e					
	HCT116		RKO		DLD-1	
	p53 +/+	p53 -/-	p53 +/+	p53 -/-	p53 +/+	p53 -/-
5-Fluoruracil	119 %	133 %	137 %	126 %	148 %	> 5000%
Irinotecan	87 %	133 %	102 %	104 %	49 %	108 %
Oxaliplatin	152 %	1190 %	145 %	201 %	180 %	882 %

Der Anstieg der Sensitivität der Kombination gegenüber der Behandlung mit 5-Fluoruracil allein, kann durch die Hemmung der TS erklärt werden. Es ist bekannt, dass die Expression von TS mit einer höheren Tumoraggressivität und schlechterer Radiosensitivität einhergeht. Ähnliches konnten die Autoren Saga et al. bei der Untersuchung an Cervix-Karzinomen beschreiben [246]. Wird die TS durch 5-Fluoruracil gehemmt, so kann die IR eine stärkere Schadensantwort auslösen. Dabei kann die ATM aktiviert werden und einen p53-abhängigen und / oder p53-unabhängigen Zelltod auslösen. Die Daten zeigen in dem hier beobachteten Zeitrahmen, dass die p53-unabhängige Schadensantwort zu einer verstärkten Apoptose führt.

Die Sensitivitätssteigerung der Kombinationen mit Irinotecan bzw. Oxaliplatin und IR beruht wahrscheinlich auf eine verstärkte Aktivierung der ATM-Kaskade.

Die p53 +/+ Zellen und die Kombinationen

Überraschend waren die Daten für die p53 +/+ Zellen. Obwohl diese Zellen bei der Einzelbehandlung im Vgl. zu den p53 -/- sensitiver gegenüber den Substanzen bzw. der Bestrahlung waren, so war das Ansprechen bei den Kombinationen weniger positiv. So führte die Kombinationsbehandlung mit CPT-11 bei den p53 +/+ Zellen nicht zu einem statistisch signifikanten Unterschied zwischen alleiniger Chemotherapie und Radiochemotherapie. Darüber hinaus führte die Kombinationsbehandlung mit CPT-11 bei den HCT116 p53 +/+ und DLD-1 p53 +/+ sogar zu statistisch signifikant geringere Anteile avitaler Zellen im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit CPT-11. Um die Wechselwirkungen beider Behandlungsmethoden im Hinblick auf synergistische oder antagonistische Wirkungen näher eruieren zu können und Isobologramm-Analysen anfertigen zu können, bedarf es weiterer fundierter Studien. Um solch eine Analyse anfertigen zu können, sind ED₅₀-Konzentrationen beider Behandlungen nötig, welche für diese Studie für die Bestrahlung nicht bestimmt wurden.

Die Kombination führt zu einer Überleitung in die G₂-Phase

Während die IR als Einzelbehandlung bei p53 +/+ Zellen einen G₁-Aufenthalt auslöst, zeigen die Versuche in der Kombination meist einen G₂-Aufenthalt. Dieser Wechsel ereignet sich meist bereits 12 Stunden nach Behandlung und bleibt bis 72 Stunden nach Behandlungsbeginn bestehen.

Da meist beide p53-Gruppen in eine G₂-Phase übergehen, wird dieser Effekt vermutlich nicht p53-abhängig ablaufen. Wie bereits beschrieben, kann ATM als Sensorprotein den Zellzyklus bei DNA-Schädigung beeinflussen und dabei in direkter Interaktion mit Chk1/Chk2 einen G₂-Phasen-Aufenthalt auslösen.

Interessant sind die Ergebnisse der DLD-1 Zellen. Diese Zelllinie wurde wie bereits beschrieben aus einem Patienten, dessen Erkrankungsgrad dem Duke C Stadium anspruch isoliert. Die Zellzyklusanalysen dieser Zelllinie zeigten in der Einzelbehandlung mit 5-Fu rasch einen Arrest in der G₁-Phase. Diesen Beobachtungen schließen sich ebenfalls die sehr hohen ED₅₀ Werte, sowie die Ergebnisse der Durchflusszytometrie. In der Kombinationsbehandlung konnte dieser Arrest regelrecht durchbrochen werden und es entwickelte sich eine sub G₁-Fraktion. Ähnliches konnte für die Behandlung mit Oxaliplatin beobachtet werden.

4.4 Ausblick

Obgleich der Nutzen der Bestimmung des p53-Mutationsstatus gegenüber anderen Markern für die Behandlung des KRK bisher geringer ist, erörtert die vorliegende Studie, weshalb sie trotzdem sinnvoll sein könnte. Das ärztliche Handeln basiert auf der Grundlage des „primum non nocere“, d.h. die bestmögliche Therapie, bei der ein höchstmöglicher Nutzen mit geringstmöglichen Nebenwirkungen besteht.

Die gesamte Polychemo-Radiotherapie wird von vielfältigen Nebenwirkungen begleitet. Diese ergeben meist die therapielimitierenden Faktoren wieder. Diese Studie zeigt u.a., dass der p53-Mutationsstatus eine wesentliche Rolle bei der Behandlung des KRK auf Zellularebene einnimmt. So konnte beispielsweise in dieser Studie gezeigt werden, dass eine alleinige Behandlung mit 5-Fluoruracil bei p53 -/- Zellen einen sehr geringen Erfolg verspricht. Jedoch kann die Kombination mit einer Bestrahlung die Sensitivität von 5-Fluoruracil wesentlich steigern. Dies ist von klinischer Relevanz durch die Tatsache, dass p53 bei ca. 50 % der Karzinome mutiert ist und somit die Patienten von einer alleinigen Therapie mit 5-Fluoruracil nicht profitieren evtl. führt solch eine alleinige Therapie zu Resistenzmechanismen und somit zu einer eventuell schlechteren Prognose.

Die bedeutsame Erkenntnis dieser Studie, welche in dieser Form in der Literatur noch nicht beschrieben wurde, ist, dass die Kombinationsbehandlung aus ionisierender Strahlung mit den etablierten Substanzen 5-Fluoruracil, Irinotecan und Oxaliplatin einen positiven Effekt bei der Behandlung eines p53 -/- Mutationsstatus hat. Die p53 +/+ Zellen zeigten in diesem Setting nicht immer die erwarteten Ergebnisse. Teilweise konnte diese Studie zeigen, dass die Kombinationsbehandlung von p53 +/+ Zellen zu schlechteren Ergebnissen führt als die alleinige Behandlung mit den Einzelsubstanzen. Dies könnte einerseits am kurzen Beobachtungszeitraum liegen. Darüber hinaus können die Unterschiede der Beobachtungen in dieser Studie an anderen Mutationen liegen.

Damit diese Erkenntnisse in einem klinischen Setting angewandt werden können, bedarf es weiterer Studien. Solche Studien können Aufschluss über die Wirkung dieser Therapien liefern und so die Signalwege der p53 -/- Zellen näher eruieren, um diese gezielt zu beeinflussen.

5. Zusammenfassung

Trotz enormer Anstrengung in der Krebsvorsorge zählt das Kolonkarzinom zu den häufigsten malignen Neoplasien des Menschen. Das Erkrankungsrisiko nimmt dabei mit dem Alter stetig zu, was unter Berücksichtigung der aktuellen demographischen Entwicklung eine stetig steigende Inzidenz nach sich zieht. Der Tumorsuppressor p53 weist dabei in über 50% der Fälle eine Mutation auf. Zur Untersuchung der Frage, welchen Einfluss der p53 Status auf die Therapie mit den etablierten Substanzen 5-Fluoruracil, Irinotecan und Oxaliplatin jeweils als Einzelsubstanz oder in Kombination mit Bestrahlung hat, wurden in der vorliegenden Arbeit etablierte isogene p53 +/+ vs. p53 -/- kolorektale Karzinom Zellmodelle *in vitro* behandelt. Hierbei wurde die proapoptotische Sensitivität der Einzelsubstanzen, der Bestrahlung und der Kombination aus IR und Substanzen bei unterschiedlichem p53-Status untersucht. Es folgten Zellzyklusanalysen und XTT-Proliferationsassays sowie die Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot.

Es konnte zum Einen gezeigt werden, dass der p53-Status einen entscheidenden Einfluss auf das Ansprechen auf die jeweilige Therapie hatte. Zum anderen unterschied sich die Sensitivität des jeweiligen therapeutischen Ansatzes auch zwischen den unterschiedlichen Zellmodellen. So zeigten auch Zelllinien mit gleichem p53 Status zum Teil erhebliche Unterschiede hinsichtlich der ED₅₀-Konzentrationen. Zu vermuten ist daher, dass hier sowohl die unterschiedliche Herkunft der Zelllinien als auch weitere Mutationen eine Rolle bei der Behandlung spielten. Die Kombination von Chemotherapie und Bestrahlung weist dabei auf ein p53-abhängiges Ansprechen hin. So führte z.B. die Kombination aus Bestrahlung und 5-Fu bei p53 -/- Zellen generell zu einer statistisch hochrelevanten Sensitivitätssteigerung, während die p53 +/+ Zellen weniger von der Kombination profitieren konnten. Interessant war darüber hinaus, dass in einigen Fällen die Kombination in den p53 +/+ Zellmodellen sogar zu einer schlechteren Sensitivität führte als die jeweilige Einzelsubstanz. Dies fiel insbesondere für die Kombination von Irinotecan und Bestrahlung auf. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass p53 -/- Zellen in unseren Untersuchungen generell von der Kombinationsbehandlung profitierten,

wohingegen das Ansprechen der p53 +/+ Zellen von weiteren Faktoren, wie unter Anderem der jeweilig gewählten Substanz, abhängig ist und sich somit nicht generell vorhersehen lässt. Weitere Studien sind hier notwendig um Rückschlüsse auf das *in vivo* Therapieansprechen in Korrelation zum p53 Status zu ziehen.

6. Literaturverzeichnis

1. *Krebs in Deutschland ... : eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.. - 10. 2011/12 (2015).* Krebs in Deutschland ... 2015.
2. *Statistisches Bundesamt, Todesursachen in Deutschland 2012.* Wiesbaden, 2013.
3. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1, 2014, AWMF Registrierungsnummer: 021-07OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> [Stand: 20.12.2014].
4. Alberts, S.R., *Update on the optimal management of patients with colorectal liver metastases.* Crit Rev Oncol Hematol, 2012. **84**(1): p. 59-70.
5. Fong, Y., et al., *Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases.* Ann Surg, 1999. **230**(3): p. 309-18; discussion 318-21.
6. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the p53 network.* Nature, 2000. **408**(6810): p. 307-10.
7. Zenz, T., et al., *Treatment resistance in chronic lymphocytic leukemia: the role of the p53 pathway.* Leuk Lymphoma, 2009. **50**(3): p. 510-3.
8. National Toxicology, P., *NTP 12th Report on Carcinogens.* Rep Carcinog, 2011. **12**: p. iii-499.
9. Caini, S., et al., *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma according to anatomical site and clinico-pathological variant.* Eur J Cancer, 2009. **45**(17): p. 3054-63.
10. Jung, E.G., *Photocarcinogenesis in the skin.* J Dermatol, 1991. **18**(1): p. 1-10.
11. Martinez, M.E., *Primary prevention of colorectal cancer: lifestyle, nutrition, exercise.* Recent Results Cancer Res, 2005. **166**: p. 177-211.
12. Xavier, R.J. and D.K. Podolsky, *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease.* Nature, 2007. **448**(7152): p. 427-34.
13. Parkin, D.M., *The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002.* Int J Cancer, 2006. **118**(12): p. 3030-44.
14. Groden, J., et al., *Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene.* Cell, 1991. **66**(3): p. 589-600.
15. Schulmann, K., et al., *HNPCC-associated small bowel cancer: clinical and molecular characteristics.* Gastroenterology, 2005. **128**(3): p. 590-9.
16. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *The multistep nature of cancer.* Trends Genet, 1993. **9**(4): p. 138-41.
17. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer.* Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
18. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation.* Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.

19. Fearon, E.R., S.R. Hamilton, and B. Vogelstein, *Clonal analysis of human colorectal tumors*. Science, 1987. **238**(4824): p. 193-7.
20. Vogelstein, B., et al., *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. N Engl J Med, 1988. **319**(9): p. 525-32.
21. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
22. Grady, W.M. and S.D. Markowitz, *Genetic and epigenetic alterations in colon cancer*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2002. **3**: p. 101-28.
23. Hirschi, B., *Genetic model of colorectal cancer and B-Raf(V600E) dependent cancer traits*, in *Dissertation, LMU München*. 2012, LMU München: München.
24. Brenner, H., et al., *Progress in colorectal cancer survival in Europe from the late 1980s to the early 21st century: the EURO CARE study*. Int J Cancer, 2012. **131**(7): p. 1649-58.
25. Anthoney, D.A., et al., *Microsatellite instability, apoptosis, and loss of p53 function in drug-resistant tumor cells*. Cancer Res, 1996. **56**(6): p. 1374-81.
26. Jass, J.R., *Colorectal cancer: a multipathway disease*. Crit Rev Oncog, 2006. **12**(3-4): p. 273-87.
27. Jass, J.R., *Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features*. Histopathology, 2007. **50**(1): p. 113-30.
28. Oki, E., et al., *Mutated gene-specific phenotypes of dinucleotide repeat instability in human colorectal carcinoma cell lines deficient in DNA mismatch repair*. Oncogene, 1999. **18**(12): p. 2143-7.
29. Scholtka, B., et al., *A gene marker panel covering the Wnt and the Ras-Raf-MEK-MAPK signalling pathways allows to detect gene mutations in 80% of early (UICC I) colon cancer stages in humans*. Cancer Epidemiol, 2009. **33**(2): p. 123-9.
30. Takai, D. and P.A. Jones, *Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3740-5.
31. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 415-28.
32. Holliday, R. and J.E. Pugh, *DNA modification mechanisms and gene activity during development*. Science, 1975. **187**(4173): p. 226-32.
33. Riggs, A.D., *X inactivation, differentiation, and DNA methylation*. Cytogenet Cell Genet, 1975. **14**(1): p. 9-25.
34. Lane, D.P. and L.V. Crawford, *T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells*. Nature, 1979. **278**(5701): p. 261-3.
35. Levine, A.J. and M. Oren, *The first 30 years of p53: growing ever more complex*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(10): p. 749-58.
36. Baker, S.J., et al., *Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas*. Science, 1989. **244**(4901): p. 217-21.

37. Levine, A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. Cell, 1997. **88**(3): p. 323-31.
38. Benchimol, S., et al., *Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17*. Somat Cell Mol Genet, 1985. **11**(5): p. 505-10.
39. McBride, O.W., D. Merry, and D. Givol, *The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(1): p. 130-4.
40. Soussi, T., C. Caron de Fromentel, and P. May, *Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution*. Oncogene, 1990. **5**(7): p. 945-52.
41. Harris, C.C. and M. Hollstein, *Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene*. N Engl J Med, 1993. **329**(18): p. 1318-27.
42. Petitjean, A., et al., *Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database*. Hum Mutat, 2007. **28**(6): p. 622-9.
43. Lin, J., et al., *Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein*. Genes Dev, 1994. **8**(10): p. 1235-46.
44. Lu, H. and A.J. Levine, *Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 5154-8.
45. Thut, C.J., et al., *p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60*. Science, 1995. **267**(5194): p. 100-4.
46. Roemer, K. and N. Mueller-Lantzsch, *p53 transactivation domain mutant Q22, S23 is impaired for repression of promoters and mediation of apoptosis*. Oncogene, 1996. **12**(10): p. 2069-79.
47. Haupt, Y., et al., *Mdm2 promotes the rapid degradation of p53*. Nature, 1997. **387**(6630): p. 296-9.
48. Bottger, V., et al., *Comparative study of the p53-mdm2 and p53-MDMX interfaces*. Oncogene, 1999. **18**(1): p. 189-99.
49. Sakamuro, D., et al., *The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest*. Oncogene, 1997. **15**(8): p. 887-98.
50. Walker, K.K. and A.J. Levine, *Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(26): p. 15335-40.
51. Bargonetti, J., et al., *A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein*. Genes Dev, 1993. **7**(12b): p. 2565-74.
52. Halazonetis, T.D., L.J. Davis, and A.N. Kandil, *Wild-type p53 adopts a 'mutant'-like conformation when bound to DNA*. Embo j, 1993. **12**(3): p. 1021-8.
53. Hollstein, M., et al., *p53 mutations in human cancers*. Science, 1991. **253**(5015): p. 49-53.

54. Hainaut, P., et al., *Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(1): p. 151-7.
55. Pavletich, N.P., K.A. Chambers, and C.O. Pabo, *The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots*. Genes Dev, 1993. **7**(12b): p. 2556-64.
56. Lee, S., et al., *p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches*. Cell, 1995. **81**(7): p. 1013-20.
57. el-Deiry, W.S., *Regulation of p53 downstream genes*. Semin Cancer Biol, 1998. **8**(5): p. 345-57.
58. Espinosa, J.M., R.E. Verdun, and B.M. Emerson, *p53 functions through stress- and promoter-specific recruitment of transcription initiation components before and after DNA damage*. Mol Cell, 2003. **12**(4): p. 1015-27.
59. el-Deiry, W.S., et al., *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression*. Cell, 1993. **75**(4): p. 817-25.
60. Miyashita, T., et al., *Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo*. Oncogene, 1994. **9**(6): p. 1799-805.
61. Nakano, K. and K.H. Vousden, *PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53*. Mol Cell, 2001. **7**(3): p. 683-94.
62. Oda, E., et al., *Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis*. Science, 2000. **288**(5468): p. 1053-8.
63. Owen-Schaub, L.B., et al., *Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(6): p. 3032-40.
64. Hublitz, P., et al., *NIR is a novel INHAT repressor that modulates the transcriptional activity of p53*. Genes Dev, 2005. **19**(23): p. 2912-24.
65. Lu, X., *Tied up in loops: positive and negative autoregulation of p53*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(5): p. a000984.
66. Kawai, H., et al., *DNA damage-induced MDMX degradation is mediated by MDM2*. J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 45946-53.
67. Gu, J., et al., *Mutual dependence of MDM2 and MDMX in their functional inactivation of p53*. J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19251-4.
68. Lev Bar-Or, R., et al., *Generation of oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop: a theoretical and experimental study*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(21): p. 11250-5.
69. Wang, S. and W.S. El-Deiry, *p73 or p53 directly regulates human p53 transcription to maintain cell cycle checkpoints*. Cancer Res, 2006. **66**(14): p. 6982-9.
70. Chipuk, J.E., et al., *PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53*. Science, 2005. **309**(5741): p. 1732-5.
71. Wu, W.S., et al., *Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma*. Cell, 2005. **123**(4): p. 641-53.

72. Yang, A., et al., *p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities*. Mol Cell, 1998. **2**(3): p. 305-16.
73. Yang, A., et al., *p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours*. Nature, 2000. **404**(6773): p. 99-103.
74. Chen, J., et al., *p53 isoform delta113p53 is a p53 target gene that antagonizes p53 apoptotic activity via BclxL activation in zebrafish*. Genes Dev, 2009. **23**(3): p. 278-90.
75. Bartek, J. and J. Lukas, *Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(6): p. 738-47.
76. Prives, C. and P.A. Hall, *The p53 pathway*. J Pathol, 1999. **187**(1): p. 112-26.
77. Meek, D.W., *Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification?* Oncogene, 1999. **18**(53): p. 7666-75.
78. Sakaguchi, K., et al., *Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53*. Biochemistry, 1997. **36**(33): p. 10117-24.
79. Shieh, S.Y., et al., *DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2*. Cell, 1997. **91**(3): p. 325-34.
80. Craig, A.L., et al., *Novel phosphorylation sites of human tumour suppressor protein p53 at Ser20 and Thr18 that disrupt the binding of mdm2 (mouse double minute 2) protein are modified in human cancers*. Biochem J, 1999. **342** (Pt 1): p. 133-41.
81. Graeber, T.G., et al., *Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(9): p. 6264-77.
82. Matoba, S., et al., *p53 regulates mitochondrial respiration*. Science, 2006. **312**(5780): p. 1650-3.
83. Jones, R.G., et al., *AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint*. Mol Cell, 2005. **18**(3): p. 283-93.
84. Palmero, I., C. Pantoja, and M. Serrano, *p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras*. Nature, 1998. **395**(6698): p. 125-6.
85. Downward, J., *Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(1): p. 11-22.
86. Sherr, C.J. and J.D. Weber, *The ARF/p53 pathway*. Curr Opin Genet Dev, 2000. **10**(1): p. 94-9.
87. Moll, U.M., et al., *Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(6): p. 631-6.
88. Moll, U.M., N. Marchenko, and X.K. Zhang, *p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction*. Oncogene, 2006. **25**(34): p. 4725-43.
89. Sansome, C., et al., *Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells*. FEBS Lett, 2001. **488**(3): p. 110-5.

90. Arima, Y., et al., *Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria*. J Biol Chem, 2005. **280**(19): p. 19166-76.
91. Zhao, J., et al., *Upregulating of Fas, integrin beta4 and P53 and depressing of PC-PLC activity and ROS level in VEC apoptosis by safrole oxide*. FEBS Lett, 2005. **579**(25): p. 5809-13.
92. Marchenko, N.D., A. Zaika, and U.M. Moll, *Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 16202-12.
93. Dumont, P., et al., *The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential*. Nat Genet, 2003. **33**(3): p. 357-65.
94. Jiang, P., et al., *The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(23): p. 9071-82.
95. Li, M., et al., *Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2*. Science, 2003. **302**(5652): p. 1972-5.
96. Marchenko, N.D., et al., *Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation*. EMBO J, 2007. **26**(4): p. 923-34.
97. Mihara, M., et al., *p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria*. Mol Cell, 2003. **11**(3): p. 577-90.
98. Leu, J.I., et al., *Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(5): p. 443-50.
99. Willis, S.N., et al., *Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins*. Genes Dev, 2005. **19**(11): p. 1294-305.
100. Heidelberger, C., et al., *Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds*. Nature, 1957. **179**(4561): p. 663-6.
101. Reyes, P., *The synthesis of 5-fluorouridine 5'-phosphate by a pyrimidine phosphoribosyltransferase of mammalian origin. I. Some properties of the enzyme from P1534J mouse leukemic cells*. Biochemistry, 1969. **8**(5): p. 2057-62.
102. Schwartz, P.M., et al., *Role of uridine phosphorylase in the anabolism of 5-fluorouracil*. Biochem Pharmacol, 1985. **34**(19): p. 3585-9.
103. Wilkinson, D.S., T.D. Tlsty, and R.J. Hanas, *The inhibition of ribosomal RNA synthesis and maturation in Novikoff hepatoma cells by 5-fluorouridine*. Cancer Res, 1975. **35**(11 Pt 1): p. 3014-20.
104. Santi, D.V., C.S. McHenry, and H. Sommer, *Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate*. Biochemistry, 1974. **13**(3): p. 471-81.
105. *National Center for Biotechnology Information. PubChem Substance Database; SID=53790063, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/53790063> (accessed Dec 23, 2015)*.
106. Luo, F.R., S.D. Wyrick, and S.G. Chaney, *Biotransformations of oxaliplatin in rat blood in vitro*. J Biochem Mol Toxicol, 1999. **13**(3-4): p. 159-69.

107. Pendyala, L. and P.J. Creaven, *In vitro* cytotoxicity, protein binding, red blood cell partitioning, and biotransformation of oxaliplatin. *Cancer Res*, 1993. **53**(24): p. 5970-6.
108. Allain, P., et al., *Early biotransformations of oxaliplatin after its intravenous administration to cancer patients*. *Drug Metab Dispos*, 2000. **28**(11): p. 1379-84.
109. Gamelin, E., et al., *Cumulative pharmacokinetic study of oxaliplatin, administered every three weeks, combined with 5-fluorouracil in colorectal cancer patients*. *Clin Cancer Res*, 1997. **3**(6): p. 891-9.
110. Mani, S., et al., *Oxaliplatin: a review of evolving concepts*. *Cancer Invest*, 2002. **20**(2): p. 246-63.
111. Lin, X., et al., *The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharmacol*, 2002. **62**(5): p. 1154-9.
112. Chaney, S., *The chemistry and biology of platinum complexes with the 1,2-diaminocyclohexane carrier ligand (review)*. *Int J Oncol*, 1995. **6**(6): p. 1291-305.
113. Saris, C.P., et al., *In vitro* formation of DNA adducts by cisplatin, lobaplatin and oxaliplatin in calf thymus DNA in solution and in cultured human cells. *Carcinogenesis*, 1996. **17**(12): p. 2763-9.
114. Kunimoto, T., et al., *Antitumor activity of 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin, a novel water-soluble derivative of camptothecin, against murine tumors*. *Cancer Res*, 1987. **47**(22): p. 5944-7.
115. Wall, M.E., et al., *Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from Camptotheca acuminata*^{1,2}. *Journal of the American Chemical Society*, 1966. **88**(16): p. 3888-3890.
116. Rothenberg, M.L., *Topoisomerase I inhibitors: review and update*. *Ann Oncol*, 1997. **8**(9): p. 837-55.
117. Rivory, L.P., *Irinotecan (CPT-11): a brief overview*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1996. **23**(10-11): p. 1000-4.
118. Kawato, Y., et al., *Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11*. *Cancer Res*, 1991. **51**(16): p. 4187-91.
119. Santos, A., et al., *Metabolism of irinotecan (CPT-11) by CYP3A4 and CYP3A5 in humans*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(5): p. 2012-20.
120. Zhao, W. and M.E. Robbins, *Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: therapeutic implications*. *Curr Med Chem*, 2009. **16**(2): p. 130-43.
121. Hada, M. and A.G. Georgakilas, *Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review*. *J Radiat Res*, 2008. **49**(3): p. 203-10.
122. Breen, A.P. and J.A. Murphy, *Reactions of oxyl radicals with DNA*. *Free Radic Biol Med*, 1995. **18**(6): p. 1033-77.
123. Hosokawa, Y., et al., *Apoptosis induced by generated OH radicals inside cells after irradiation*. *Arch Histol Cytol*, 2002. **65**(4): p. 301-5.

124. Olive, P.L., *The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation*. Radiat Res, 1998. **150**(5 Suppl): p. S42-51.
125. Goodhead, D.T., *Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA*. Int J Radiat Biol, 1994. **65**(1): p. 7-17.
126. Ward, J.F., *DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1988. **35**: p. 95-125.
127. Schmitz, A., et al., *Intrinsic susceptibility to radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003. **57**(3): p. 769-78.
128. Hall, E.J., *Radiobiology for the radiologist [by] Eric J. Hall*. 1973, Hagerstown, Md: Medical Dept., Harper & Row.
129. Munro, T.R., *The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts*. Radiat Res, 1970. **42**(3): p. 451-70.
130. International Commission on Radiation, U. and Measurements, *Report 85: Fundamental quantities and units for ionizing radiation*. J ICRU, 2011. **11**(1): p. 1-31.
131. Powell, S. and T.J. McMillan, *DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation*. Radiother Oncol, 1990. **19**(2): p. 95-108.
132. Vogt, C., *Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (Alytes obstetricans)*. . Neue Janaische Allgemeine Literatur-Zeitung. Vol. Erster Jahrgang, Nr. 68. 1842. 281-284.
133. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
134. Wyllie, A.H., J.F. Kerr, and A.R. Currie, *Cell death: the significance of apoptosis*. Int Rev Cytol, 1980. **68**: p. 251-306.
135. Dudenredaktion, D.D.D.d.R.B.v.n.b.u.e.M.D., Bibliographisches Institut & F.A. Brockhaus, 2006.
136. Denis, F., et al., *The role of caspases in T cell development and the control of immune responses*. Cell Mol Life Sci, 1998. **54**(9): p. 1005-19.
137. Cory, S. and J.M. Adams, *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(9): p. 647-56.
138. Gerschenson, L.E. and R.J. Rotello, *Apoptosis: a different type of cell death*. FASEB J, 1992. **6**(7): p. 2450-5.
139. Lauber, K., et al., *Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal*. Cell, 2003. **113**(6): p. 717-30.
140. Kischkel, F.C., et al., *Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 46639-46.
141. Alnemri, E.S., et al., *Human ICE/CED-3 protease nomenclature*. Cell, 1996. **87**(2): p. 171.

142. Fischer, U., R.U. Janicke, and K. Schulze-Osthoff, *Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 76-100.
143. Schafer, Z.T. and S. Kornbluth, *The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation*. Dev Cell, 2006. **10**(5): p. 549-61.
144. Kook, S., et al., *Caspase-cleaved arrestin-2 and BID cooperatively facilitate cytochrome C release and cell death*. Cell Death Differ, 2014. **21**(1): p. 172-84.
145. Zou, H., et al., *Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3*. Cell, 1997. **90**(3): p. 405-13.
146. Cain, K., et al., *Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22686-92.
147. Irmeler, M., et al., *Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP*. Nature, 1997. **388**(6638): p. 190-5.
148. Wajant, H., et al., *Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD)*. J Biol Chem, 2000. **275**(32): p. 24357-66.
149. Crook, N.E., R.J. Clem, and L.K. Miller, *An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif*. J Virol, 1993. **67**(4): p. 2168-74.
150. Birnbaum, M.J., R.J. Clem, and L.K. Miller, *An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs*. J Virol, 1994. **68**(4): p. 2521-8.
151. Silke, J. and D.L. Vaux, *Two kinds of BIR-containing protein - inhibitors of apoptosis, or required for mitosis*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 10): p. 1821-7.
152. Kirkin, V., S. Joos, and M. Zornig, *The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1644**(2-3): p. 229-49.
153. Tsujimoto, Y., et al., *Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma*. Science, 1985. **228**(4706): p. 1440-3.
154. Adams, J.M. and S. Cory, *The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1322-6.
155. Gross, A., J.M. McDonnell, and S.J. Korsmeyer, *BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**(15): p. 1899-911.
156. Korsmeyer, S.J., et al., *Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c*. Cell Death Differ, 2000. **7**(12): p. 1166-73.
157. Strasser, A., *The role of BH3-only proteins in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(3): p. 189-200.
158. Tsujimoto, Y., *Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria*. J Cell Physiol, 2003. **195**(2): p. 158-67.
159. Hussain, S.P. and C.C. Harris, *Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens*. Mutat Res, 2000. **462**(2-3): p. 311-22.

160. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell, 1997. **91**(2): p. 231-41.
161. del Peso, L., et al., *Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt*. Science, 1997. **278**(5338): p. 687-9.
162. Searle, J., J.F. Kerr, and C.J. Bishop, *Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance*. Pathol Annu, 1982. **17 Pt 2**: p. 229-59.
163. Leist, M. and M. Jaattela, *Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001. **2**(8): p. 589-598.
164. Flemming, W., *Beiträge zur Kenntniss der Zelle und Ihrer Lebenserscheinungen*. Archiv für mikroskopische Anatomie, 1880. **18**(1): p. 151-259.
165. Hooper, C.E., *Cell turnover in epithelial populations*. J Histochem Cytochem, 1956. **4**(6): p. 531-40.
166. Hooper, C.E., *Use of colchicine for the measurement of mitotic rate in the intestinal epithelium*. Am J Anat, 1961. **108**: p. 231-44.
167. Cameron, I.L. and R.C. Greulich, *Evidence for an essentially constant duration of DNA synthesis in renewing epithelia of the adult mouse*. J Cell Biol, 1963. **18**: p. 31-40.
168. Zhu, X., A.K. Raina, and M.A. Smith, *Cell cycle events in neurons. Proliferation or death?* Am J Pathol, 1999. **155**(2): p. 327-9.
169. Murray, A.W., *Recycling the cell cycle: cyclins revisited*. Cell, 2004. **116**(2): p. 221-34.
170. Malumbres, M. and M. Barbacid, *To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(3): p. 222-31.
171. O'Connor, D.S., et al., *A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer*. Cancer Cell, 2002. **2**(1): p. 43-54.
172. Classon, M. and E. Harlow, *The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(12): p. 910-7.
173. Massague, J., *G1 cell-cycle control and cancer*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 298-306.
174. Donzelli, M. and G.F. Draetta, *Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation*. EMBO Rep, 2003. **4**(7): p. 671-7.
175. Kastan, M.B. and J. Bartek, *Cell-cycle checkpoints and cancer*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 316-23.
176. Zhang, X., et al., *Role of Gadd45alpha in the density-dependent G1 arrest induced by p27(Kip1)*. Oncogene, 2003. **22**(27): p. 4166-74.
177. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation*. Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 807-69.
178. Seger, R. and E.G. Krebs, *The MAPK signaling cascade*. FASEB J, 1995. **9**(9): p. 726-35.

179. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
180. Hanafusa, H., et al., *Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(11): p. 850-8.
181. Ryan, P.E., et al., *Regulating the regulator: negative regulation of Cbl ubiquitin ligases*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(2): p. 79-88.
182. Kim, H.J. and D. Bar-Sagi, *Modulation of signalling by Sprouty: a developing story*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(6): p. 441-50.
183. Wu, H., H. Li, and J. Guo, *Spry2-mediated inhibition of the Ras/ERK pathway through interaction with Src kinase following cerebral ischemia*. Brain Inj, 2008. **22**(3): p. 275-81.
184. Kampman, E., et al., *Animal products and K-ras codon 12 and 13 mutations in colon carcinomas*. Carcinogenesis, 2000. **21**(2): p. 307-9.
185. Bleeker, W.A., et al., *Prognostic significance of K-ras and TP53 mutations in the role of adjuvant chemotherapy on survival in patients with Dukes C colon cancer*. Dis Colon Rectum, 2001. **44**(3): p. 358-63.
186. Esteller, M., et al., *K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2001. **19**(2): p. 299-304.
187. Di Nicolantonio, F., et al., *Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(35): p. 5705-12.
188. Cailliez, F. and R. Lavery, *Cadherin mechanics and complexation: the importance of calcium binding*. Biophys J, 2005. **89**(6): p. 3895-903.
189. Strober, W., *Trypan blue exclusion test of cell viability*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Appendix 3**: p. Appendix 3B.
190. Tam, R.Y., et al., *Hydration index--a better parameter for explaining small molecule hydration in inhibition of ice recrystallization*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(51): p. 17494-501.
191. Lindl, T., *Zell- und Gewebekultur : Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*. 4., überarb. und erw. Aufl. ed. 2000, Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad. Verl. IX, 281.
192. Dittrich, W. and W. Gohde, *[Impulse fluorometry of single cells in suspension]*. Z Naturforsch B, 1969. **24**(3): p. 360-1.
193. Gohde, W., *[Use of flow cuvettes for the evaluation of density gradients in the preparative ultracentrifuge]*. Z Naturforsch B, 1969. **24**(2): p. 250.
194. Fadok, V.A., et al., *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. J Immunol, 1992. **148**(7): p. 2207-16.
195. Op den Kamp, J.A., *Lipid asymmetry in membranes*. Annu Rev Biochem, 1979. **48**: p. 47-71.

196. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. J Immunol Methods, 1995. **184**(1): p. 39-51.
197. Hudson, B., et al., *The use of an ethidium analogue in the dye-buoyant density procedure for the isolation of closed circular DNA: the variation of the superhelix density of mitochondrial DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1969. **62**(3): p. 813-20.
198. Nicoletti, I., et al., *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. J Immunol Methods, 1991. **139**(2): p. 271-9.
199. Scudiero, D.A., et al., *Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines*. Cancer Res, 1988. **48**(17): p. 4827-33.
200. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
201. Harten, U., *Physik für Mediziner*, in *Springer-Lehrbuch : SpringerLink : Bücher*. 2014, Springer: Berlin, Heidelberg.
202. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
203. Wilson, P.M., M.J. Labonte, and H.J. Lenz, *Molecular markers in the treatment of metastatic colorectal cancer*. Cancer J, 2010. **16**(3): p. 262-72.
204. Brattain, M.G., et al., *Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma*. Cancer Res, 1981. **41**(5): p. 1751-6.
205. Yan, T., et al., *DNA mismatch repair (MMR) mediates 6-thioguanine genotoxicity by introducing single-strand breaks to signal a G2-M arrest in MMR-proficient RKO cells*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(6): p. 2327-34.
206. Dexter, D.L., J.A. Barbosa, and P. Calabresi, *N,N-dimethylformamide-induced alteration of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human colon carcinoma cells*. Cancer Res, 1979. **39**(3): p. 1020-5.
207. Tsukada, T., et al., *Enhanced proliferative potential in culture of cells from p53-deficient mice*. Oncogene, 1993. **8**(12): p. 3313-22.
208. Harvey, M., et al., *In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice*. Oncogene, 1993. **8**(9): p. 2457-67.
209. Bunz, F., et al., *Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents*. J Clin Invest, 1999. **104**(3): p. 263-9.
210. Longley, D.B., et al., *The role of thymidylate synthase induction in modulating p53-regulated gene expression in response to 5-fluorouracil and antifolates*. Cancer Res, 2002. **62**(9): p. 2644-9.
211. Boyer, J., et al., *Characterization of p53 wild-type and null isogenic colorectal cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(6): p. 2158-67.

212. Russo, A., et al., *The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment*. J Clin Oncol, 2005. **23**(30): p. 7518-28.
213. Ju, J., et al., *Regulation of p53 expression in response to 5-fluorouracil in human cancer RKO cells*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(14): p. 4245-51.
214. Chu, E., et al., *Thymidylate synthase protein and p53 mRNA form an in vivo ribonucleoprotein complex*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(2): p. 1582-94.
215. Ju, J., et al., *Regulation of p53 expression by thymidylate synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3769-74.
216. Bhonde, M.R., et al., *DNA damage-induced expression of p53 suppresses mitotic checkpoint kinase hMps1: the lack of this suppression in p53MUT cells contributes to apoptosis*. J Biol Chem, 2006. **281**(13): p. 8675-85.
217. Castedo, M., et al., *Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy*. Oncogene, 2004. **23**(25): p. 4362-70.
218. Dexter, D.L., et al., *Heterogeneity of cancer cells from a single human colon carcinoma*. Am J Med, 1981. **71**(6): p. 949-56.
219. Ehrig, K., et al., *Growth inhibition of different human colorectal cancer xenografts after a single intravenous injection of oncolytic vaccinia virus GLV-1h68*. J Transl Med, 2013. **11**: p. 79.
220. Dukes, C.E., *The classification of cancer of the rectum*. The Journal of Pathology and Bacteriology, 1932. **35**(3): p. 323-332.
221. Wittekind, C., [2010 TNM system: on the 7th edition of TNM classification of malignant tumors]. Pathologe, 2010. **31**(5): p. 331-2.
222. Houghton, J.A., et al., *Inhibition of apoptosis after thymineless stress is conferred by oncogenic K-Ras in colon carcinoma cells*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(11): p. 2841-8.
223. Etienne-Grimaldi, M.C., et al., *K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(15): p. 4830-5.
224. Hu, Y.C., et al., *Thymidylate synthase expression predicts the response to 5-fluorouracil-based adjuvant therapy in pancreatic cancer*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(11): p. 4165-71.
225. Derenzini, M., et al., *Thymidylate synthase protein expression and activity are related to the cell proliferation rate in human cancer cell lines*. Mol Pathol, 2002. **55**(5): p. 310-4.
226. Aizu, W., et al., *Circumvention and reactivation of the p53 oncogene checkpoint in mouse colon tumors*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(8): p. 981-91.
227. Aliouat-Denis, C.M., et al., *p53-independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by Chk2*. Mol Cancer Res, 2005. **3**(11): p. 627-34.
228. Yang, B., et al., *Wild-type p53 protein potentiates cytotoxicity of therapeutic agents in human colon cancer cells*. Clin Cancer Res, 1996. **2**(10): p. 1649-57.

229. Tan, K.B., et al., *Nonproductive rearrangement of DNA topoisomerase I and II genes: correlation with resistance to topoisomerase inhibitors*. J Natl Cancer Inst, 1989. **81**(22): p. 1732-5.
230. Jacob, S., et al., *The role of the DNA mismatch repair system in the cytotoxicity of the topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide to human colorectal cancer cells*. Cancer Res, 2001. **61**(17): p. 6555-62.
231. Lansiaux, A., et al., *Topoisomerase I-DNA covalent complexes in human colorectal cancer xenografts with different p53 and microsatellite instability status: relation with their sensitivity to CTP-11*. Anticancer Res, 2001. **21**(1A): p. 471-6.
232. McNamee, L.M. and M.H. Brodsky, *p53-independent apoptosis limits DNA damage-induced aneuploidy*. Genetics, 2009. **182**(2): p. 423-35.
233. Rotman, G. and Y. Shiloh, *ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress*. Oncogene, 1999. **18**(45): p. 6135-44.
234. Aoki, H., et al., *Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 10244-50.
235. Cao, Y., et al., *Synergistic effects of topoisomerase I inhibitor, SN38, on Fas-mediated apoptosis*. Anticancer Res, 2010. **30**(10): p. 3911-7.
236. Reed, E., *Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy*. Cancer Treat Rev, 1998. **24**(5): p. 331-44.
237. Raymond, E., et al., *Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(3): p. 227-35.
238. Pires, I.M., T.H. Ward, and C. Dive, *Oxaliplatin responses in colorectal cancer cells are modulated by CHK2 kinase inhibitors*. Br J Pharmacol, 2010. **159**(6): p. 1326-38.
239. Toscano, F., et al., *p53 dependent and independent sensitivity to oxaliplatin of colon cancer cells*. Biochem Pharmacol, 2007. **74**(3): p. 392-406.
240. Voland, C., et al., *Repression of cell cycle-related proteins by oxaliplatin but not cisplatin in human colon cancer cells*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(9): p. 2149-57.
241. Hata, T., et al., *Role of p21waf1/cip1 in effects of oxaliplatin in colorectal cancer cells*. Mol Cancer Ther, 2005. **4**(10): p. 1585-94.
242. Hutchinson, F., *Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1985. **32**: p. 115-54.
243. Lee, J.M. and A. Bernstein, *p53 mutations increase resistance to ionizing radiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(12): p. 5742-6.
244. Fei, P. and W.S. El-Deiry, *P53 and radiation responses*. Oncogene, 2003. **22**(37): p. 5774-83.
245. Marcussen, M. and P.J. Larsen, *Cell cycle-dependent regulation of cellular ATP concentration, and depolymerization of the interphase microtubular network induced by elevated cellular ATP concentration in whole fibroblasts*. Cell Motil Cytoskeleton, 1996. **35**(2): p. 94-9.

246. Saga, Y., et al., *Enhanced expression of thymidylate synthase mediates resistance of uterine cervical cancer cells to radiation*. *Oncology*, 2002. **63**(2): p. 185-91.

7. Selbständigkeitserklärung

Die Arbeit wurde in der medizinischen Klinik II - Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie, Rheumatologie und Pulmologie des Universitätsklinikum Tübingen unter Betreuung von Herrn PD Dr. med. Marcus Schittenhelm durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Kerstin Kampa-Schittenhelm und Herrn PD Dr. med. Arndt-Christian Müller.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. med. Kerstin Kampa-Schittenhelm und Labormitglieder Frau Dr. rer. nat. Barbara Illing und Frau Figen Akmut von mir eigenständig durchgeführt. Die Einarbeitung für die Zellbestrahlung erfolgte durch Herrn PD Dr. med. Arndt-Christian Müller, Frau Heidrun Faltin und Frau Ilka Müller.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Alfio Milazzo

8. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Kanz für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Herrn PD Dr. med. Marcus Schittenhelm und Frau Dr. med. Kerstin Kampa-Schittenhelm danke ich für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und für die kompetente Betreuung. Ich danke Ihnen für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und für die Möglichkeit, ein breites Spektrum der Methoden erlernen zu dürfen. Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. Kampa-Schittenhelm und für die bereitwillige Korrektur und konstruktive Kritik der vorliegenden Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich Frau Dr. rer. nat. Illing, Frau Akmut und Frau Rasp für die technische Unterstützung sowie moralische Unterstützung im Labor danken. Ein besonderer Dank geht an Frau cand. med. Haller.

Des Weiteren danke ich Herrn PD Dr. med. Arndt-Christian Müller aus der Universitätsklinik für Radioökologie Tübingen sowie Frau Faltin und Frau Müller für die Einarbeitung und Unterstützung der Bestrahlungen am Linearbeschleuniger.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Niethammer – ehemaliger ärztlicher Direktor Universitätskinderklinik Tübingen – und Herrn Dr. Dopfer – ehemaliger ärztlicher Direktor der Nachsorgeklinik Tannheim – die mich überordentlich für das Fach Humanmedizin motivierten.

Allen meinen Dozentinnen und Dozenten der Universität Tübingen danke ich für das mir vermittelte Wissen während des Studiums.

Ganz herzlich möchte ich meinen Eltern, Geschwistern und engsten Freunden danken für Ihre ständige Unterstützung.

Vielen Dank.

Curriculum vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.