

## VII. Ergebnisse

### 1. Morphologische Untersuchung des Verlaufes der mitotischen Katastrophe nach SN-38-Behandlung

#### 1.1. Transformation der Zellkerne während der mitotischen Katastrophe

Zur Untersuchung des Verlaufes der durch SN-38-induzierten mitotischen Katastrophe habe ich die HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen mit SN-38 (10 nM für 48 h) behandelt und die Veränderung der Kernmorphologie nach DAPI-Färbung mikroskopisch untersucht. Zum Vergleich wurden HCT116-p53<sup>wt</sup>-Zellen behandelt, die keine mitotische Katastrophe, sondern einen langanhaltenden tetraploiden-Arrest durchführen.

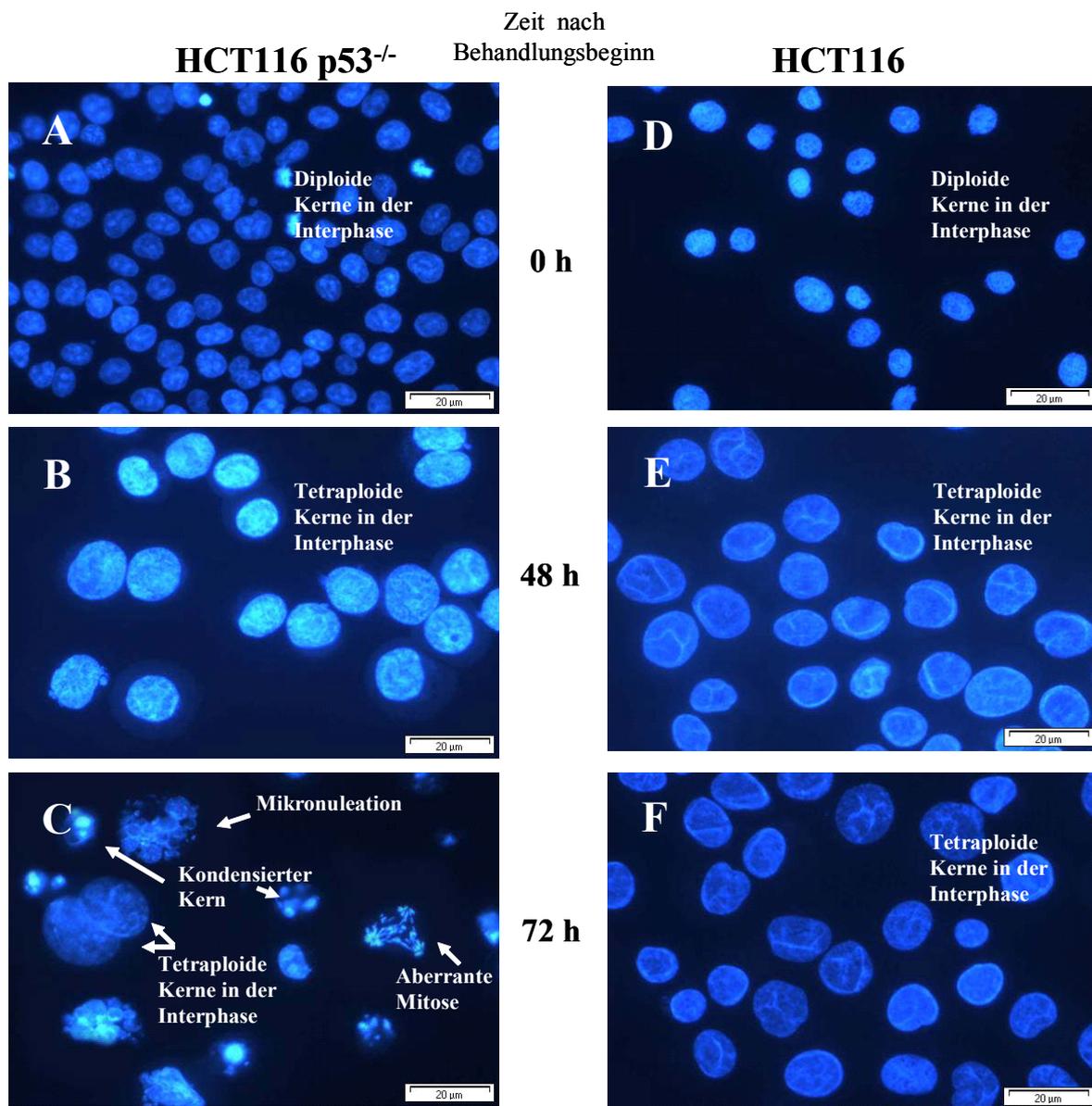


Fig. 10: Zellkerntransformation während der mitotischen Katastrophe

Zellkerntransformation in HCT116-p53<sup>-/-</sup>- und HCT116-Zellen nach SN-38-Behandlung: 72 Stunden nach Behandlung der p53<sup>-/-</sup>-Zellen sind vier Typen von Kernformen zu sehen: tetraploide Kerne in der Interphase, aberrante Mitosen, Mikronukleationen und kondensierte Kerne (C)

In HCT116-p53<sup>wt</sup>-Zellen entstehen 48 Stunden nach Behandlungsbeginn aus diploiden Zellkernen tetraploide Zellkerne (Fig. 10 E), die 72 Stunden nach Behandlungsbeginn noch in der Interphase vorliegen (Fig. 10 F), d. h., die Zellen führen einen lang anhaltenden tetraploiden Arrest durch. In HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen entstehen 48 Stunden nach Behandlungsbeginn auch tetraploide Zellkerne. 72 Stunden nach Behandlungsbeginn wurden in p53<sup>-/-</sup>-Zellen vier Typen von Kernformen beobachtet: tetraploide Kerne in der Interphase, aberrante Mitosen, Mikronukleationen und kondensierte Kerne (Fig. 10 C).

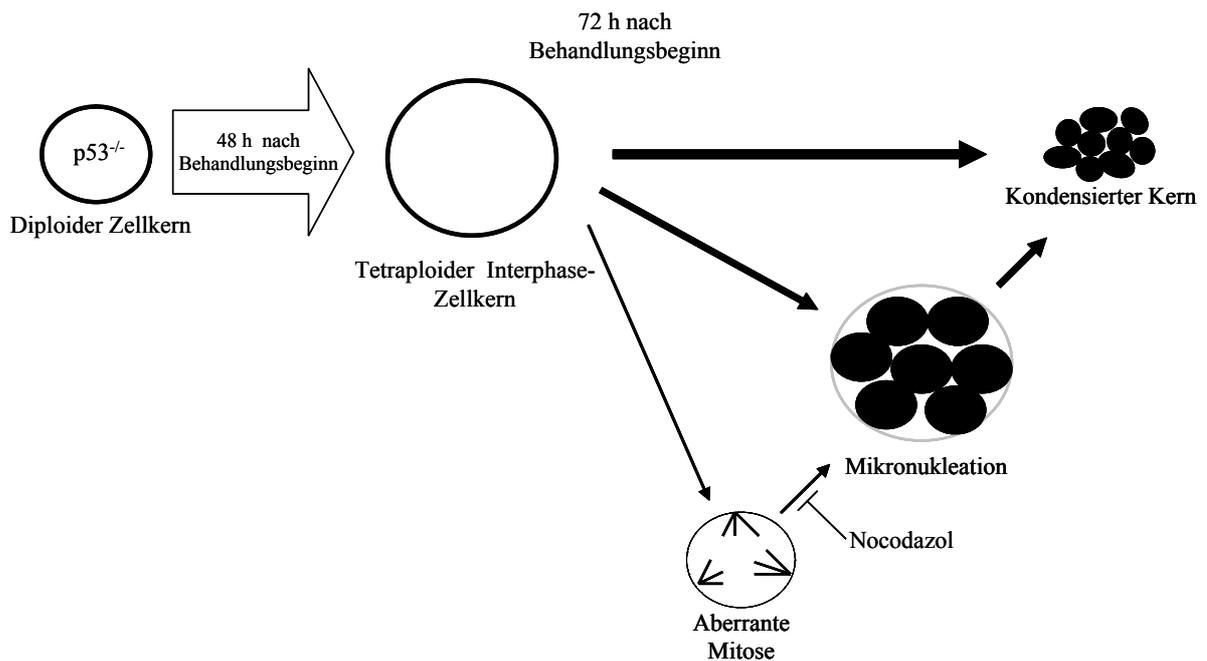


Fig. 11: Schematische Darstellung der verschiedenen Kernformen und ihre hypothetische Reihenfolge

Tetraploide Zellkerne sind etwa doppelt so groß wie die diploiden Zellkerne. Aberrante Mitosen sind Mitosen mit mindestens drei Zellpolen. Bei Mikronukleationen handelt es sich um fusionierte Zellkernfragmente, die sich noch in einer intakten Zellkernmembran befinden. Kondensierte Kerne sind stark mit DAPI anfärbbare, leuchtende Zellkernfragmente, deren Zellkernmembran nicht mehr vorhanden ist.

Zum besseren Verständnis des Verlaufs der mitotischen Katastrophe habe ich den Zeitverlauf des Auftretens der einzelnen Zellkernformen nach SN-38-Behandlung in p53<sup>-/-</sup>- und p53<sup>+/+</sup>-Zellen dargestellt.

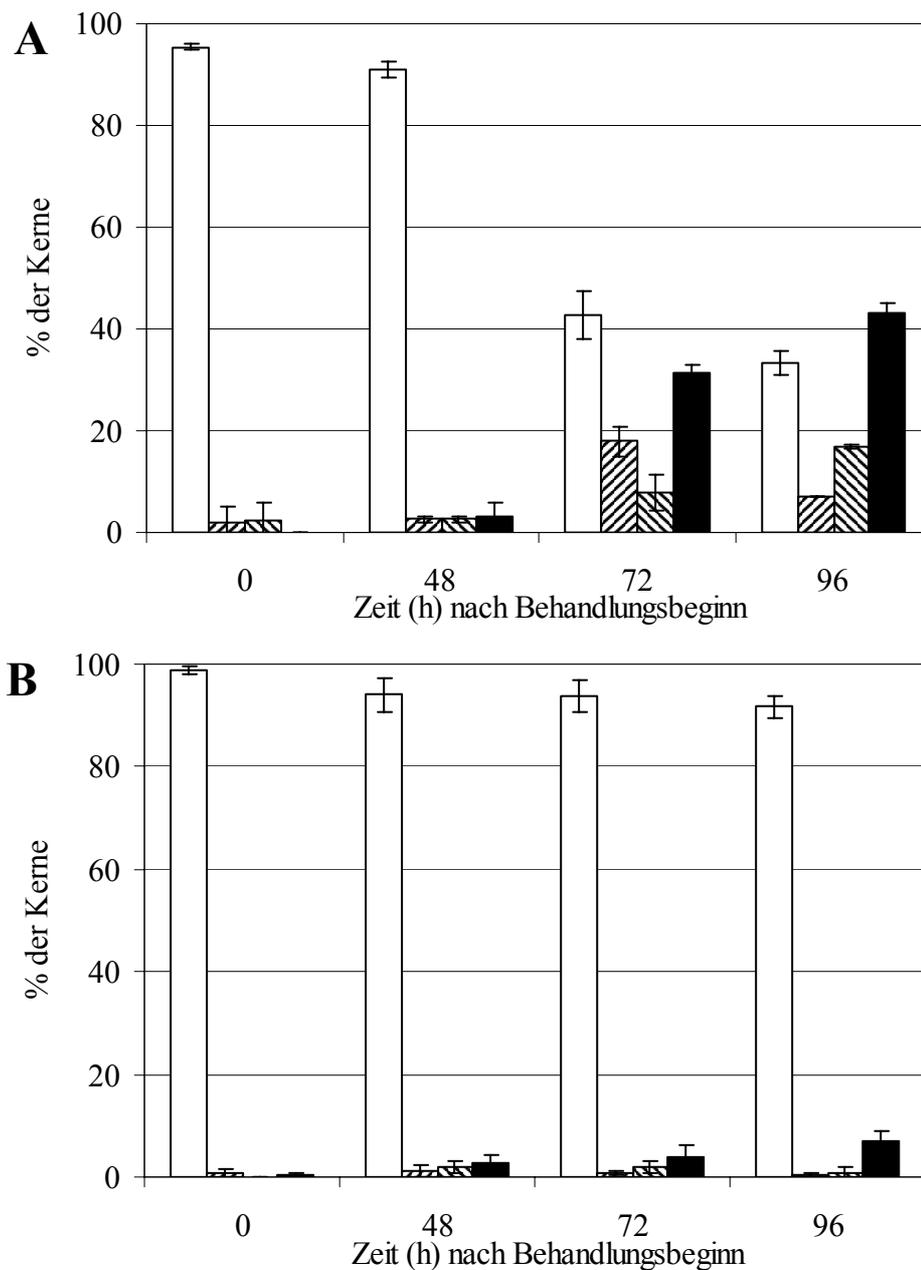


Fig. 12: Zeitverlauf der morphologischen Veränderung der Zellkerne nach SN-38-Behandlung. Prozentsätze der jeweiligen Kernform in **A**: HCT116 p53<sup>-/-</sup> und in **B**: HCT116-p53<sup>wt</sup>-Zellen nach SN-38-Behandlung. □ Interphasen, ▨ aberrante Mitosen, ▩ Mikronukleationen, ■ kondensierte Kerne. Ergebnisse von vier Experimenten ± SD.

Während in p53<sup>+/+</sup>-Zellen die Zellkerne in der Interphase bleiben (Fig. 12 B), erhöht sich in den p53<sup>-/-</sup>-Zellen der Prozentsatz der kondensierten Kerne (Fig. 12 A). Somit erscheint der kondensierte Kern als die Endform der mitotischen Katastrophe.

## 1.2. Mitotische Katastrophe mündet in Apoptose

Zur Identifikation der apoptotischen Formen habe ich die HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen mit SN-38 behandelt und 96 Stunden nach Behandlungsbeginn immunhistochemisch die PARP-Spaltung, als Marker der Apoptose, detektiert.

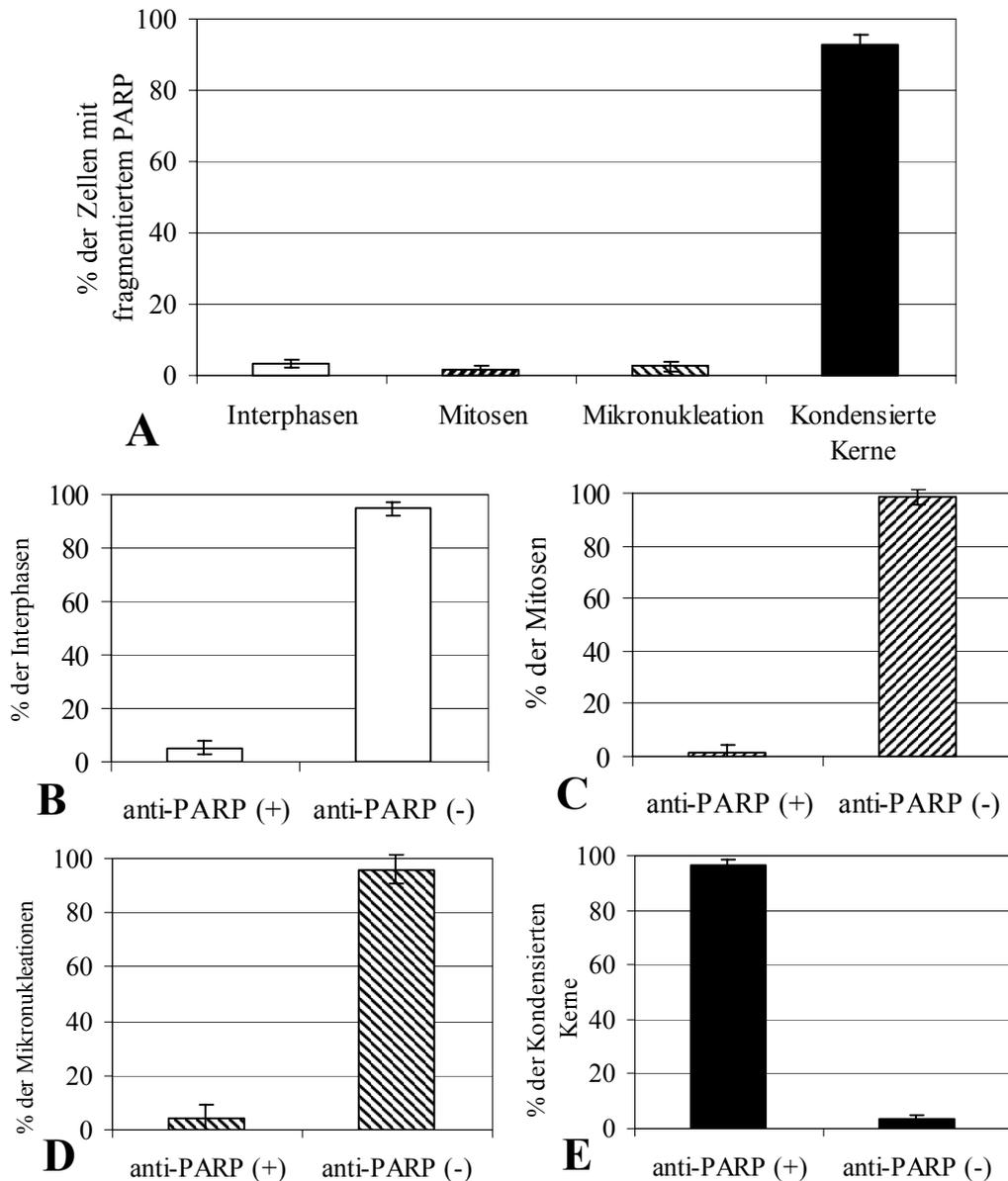


Fig. 13: (A-E) Fast alle kondensierten Kerne weisen fragmentiertes PARP auf  
Die Grafik A zeigt den Prozentsatz der Zellen mit fragmentierten PARP in Zellgruppen mit definierter Kernmorphologie. Die Grafiken B, C, D, E zeigen in welchem Prozentsatz der jeweiligen Kernform PARP-Fragmentierung stattfindet. Resultate von jeweils drei Experimenten  $\pm$  SD.

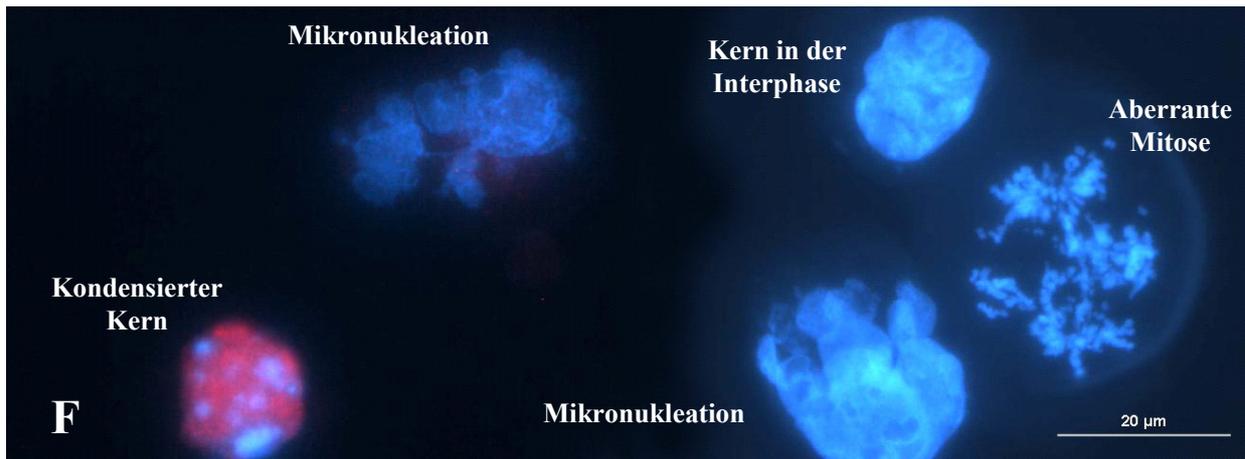


Fig. 13: (F) *Fast alle kondensierten Kerne weisen fragmentiertes PARP auf*  
 Das Bild F zeigt eine immunhistochemische Färbung der HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen mit anti-PARP-Fragment 85 kDa (rot) und mit DAPI (blau) 96 h nach Behandlungsbeginn mit SN-38 und ist repräsentativ für alle Experimente. Balken: 20 µm.

Circa 92 % der Kerne mit fragmentierten PARP sind kondensiert (Fig. 13 A). Fast alle Interphasen, Mitosen und Mikronukleationen offenbaren keine PARP-Fragmentation (Fig. 13 B, C, D, E). Circa 95 % aller kondensierten Kerne zeigen PARP-Fragmentierung. Daraus folgt, dass der Schritt der Kernkondensation mit Apoptose assoziiert ist.

### 1.3. SN-38-induzierte Apoptose in HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen findet vor und die Entscheidung zur Bildung von Mikronukleationen nach der Prometaphase statt

Zur Überprüfung, von welcher Phase des Zellzyklus die mitotische Katastrophe ausgeht, wurden die HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen mit SN-38 behandelt und 48 Stunden nach Behandlungsbeginn mit Nocodazol (50 ng/ml für 48 Stunden) in der Prometaphase arretiert. Die Apoptose wurde mittels einer PARP- und die Kernmorphologie mittels einer DAPI-Färbung dargestellt.

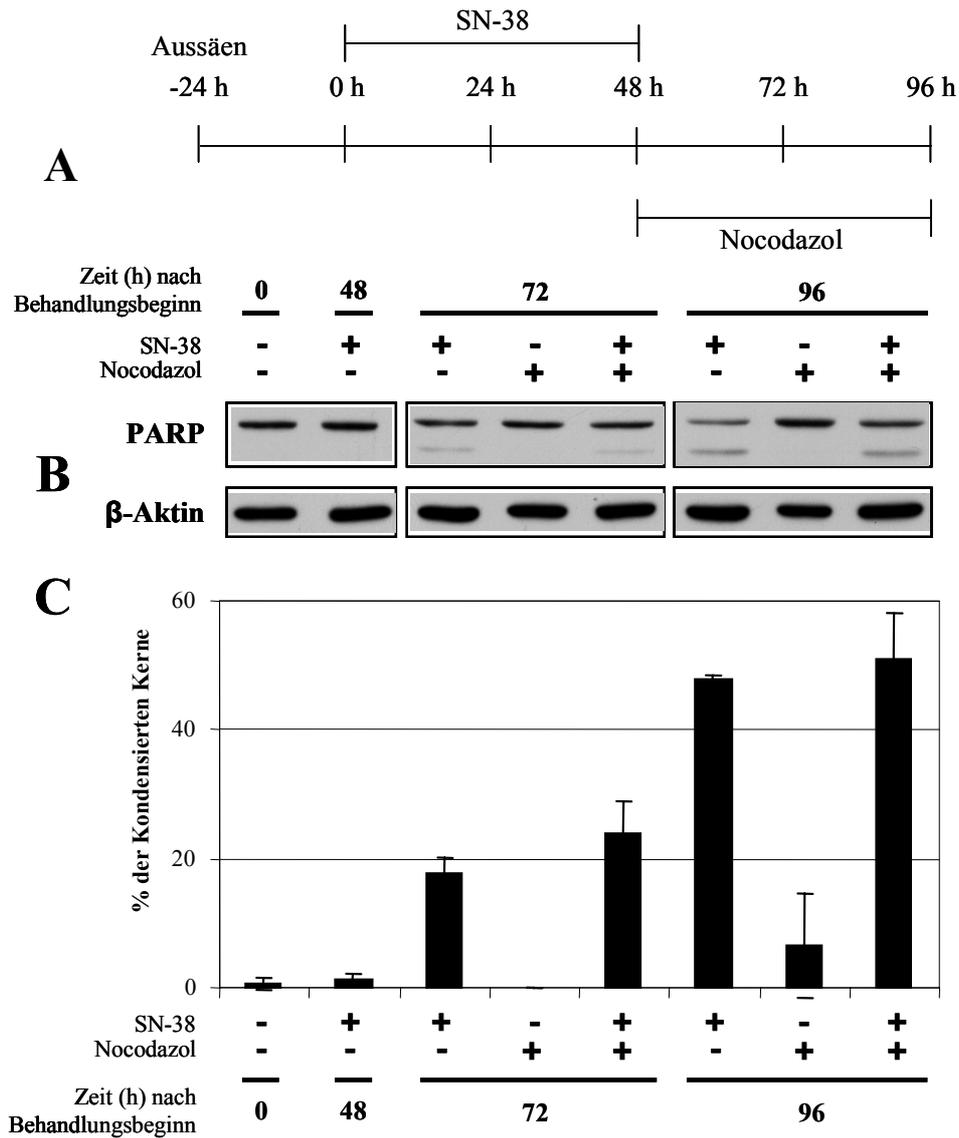


Fig. 14: (A-C) *Nocodazol inhibiert nicht die SN-38-induzierte Apoptose*

**A:** Zeitschema des Experimentes. **B:** PARP-Fragmentierung in HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen nach SN-38-Behandlung und Nocodazol-Arrest (50 ng/ml für 48 Stunden) -Behandlung. Zeitpunkte 48, 72 und 96 Stunden nach Behandlungsbeginn mit SN-38. 20  $\mu$ g Protein wurde in jeder Bahn aufgetragen.  $\beta$ -Aktin wurde detektiert, um die Gleichheit der Mengen von Proteinen in jeder Bahn zu überprüfen. Die Resultate sind repräsentativ für zwei Experimente. **C:** Apoptoserate nach SN-38- und Nocodazol-Behandlung, ermittelt durch eine Auszählung der kondensierten Kerne. Mittelwerte von drei Experimenten  $\pm$  SD.

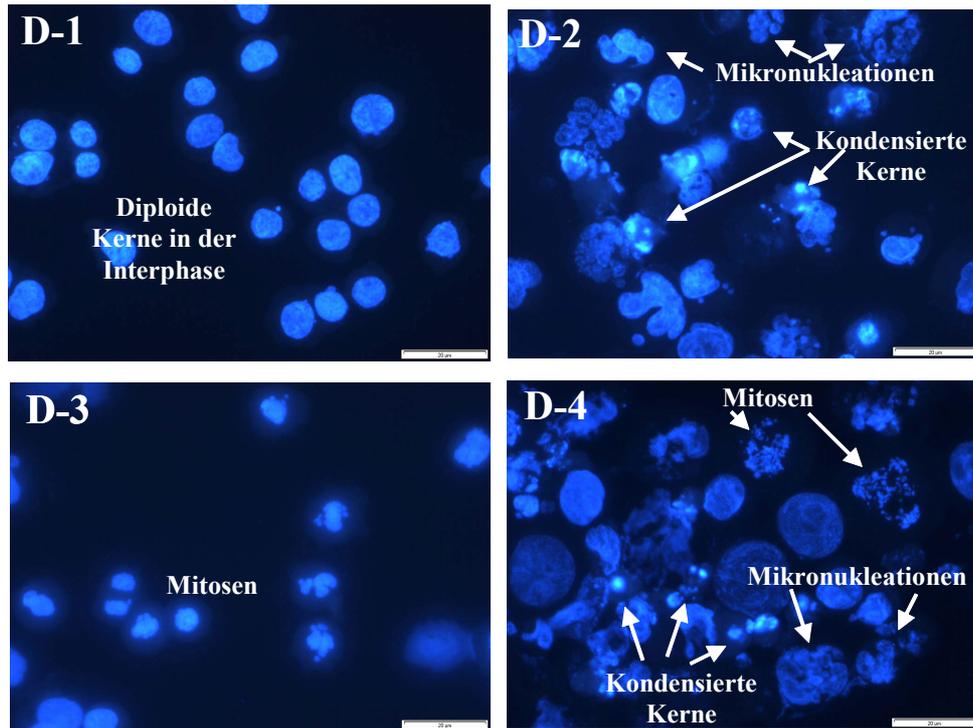


Fig. 14: (D) *Nocodazol inhibiert nicht die SN-38-induzierte Apoptose (DAPI-Färbung)*

**D-1:** Nicht behandelte HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen. **D-2:** HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen 72 Stunden nach Behandlungsbeginn mit SN-38. **D-3:** HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen 72 Stunden nach Behandlungsbeginn mit Nocodazol. **D-4:** HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen 72 Stunden nach Behandlungsbeginn mit SN-38 und Nocodazol. Die Bilder sind repräsentativ für vier Experimente. Weißer Balken: 20 µm.

Das Ausmaß der PARP-Fragmentierung hat sich trotz des Nocodazol-Arrestes nicht signifikant verändert (Fig. 14 B), was dafür spricht, dass Nocodazol die Apoptose nicht inhibiert. Dieses spiegelt sich in der konstanten Zahl der kondensierten Kerne wider (Fig. 14 C).



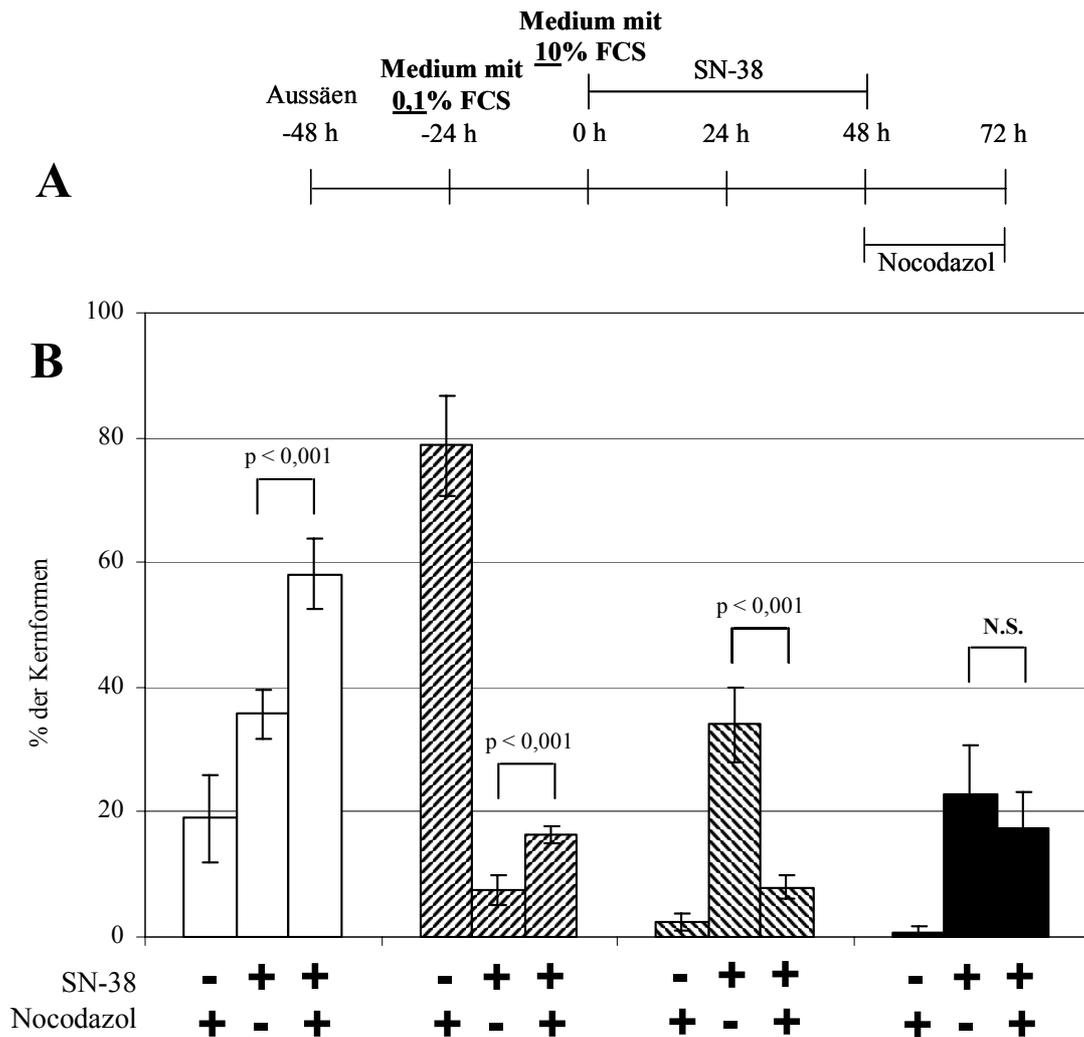


Fig. 16: Nocodazol inhibiert die SN-38-induzierte Mikronukleation, aber nicht die Kernkondensation  
**A:** Versuchsprotokoll. **B:** Prozentsatz der Kernformen in HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen zum Zeitpunkt 72 Stunden nach Behandlungsbeginn mit SN-38. □ Interphasen, ▨ aberrante Mitosen, ▩ Mikronukleationen, ■ kondensierte Kerne. Ergebnisse von vier Experimenten ± SD. N.S. nicht signifikant.

Wie in Fig. 15 inhibiert eine zehnfach höhere Nocodazol-Konzentration (500 ng/ml für 24 Stunden) auch signifikant (t-test,  $p < 0,001$ ) die SN-38-induzierte Mikronukleation zum 72 Stunden Zeitpunkt, aber nicht die kondensierten Kerne. Die Prozentzahl der SN-38-induzierten Interphasen und aberranten Mitosen (t-test,  $p < 0,001$ ) ist dieses Mal signifikant erhöht. Nocodazol arretiert ca. 80 % der Zellen in der Mitose, nach der SN-38-Behandlung nur noch ca. 20 %. Circa 60 % der Zellen sind durch SN-38-Behandlung in G<sub>2</sub> arretiert. Dieser Arrest in der G<sub>2</sub>-Phase ist mit der Erhöhung der Mikronukleationen und Interphasen assoziiert. Die Daten sprechen dafür, dass man zwei unabhängige Wege der Kerntransformation fordern muss. Die Hypothese ist, dass kondensierte Kerne nicht nur aus Mikronukleationen, sondern direkt auch aus Interphasen entstehen können (Fig. 17 B, C).

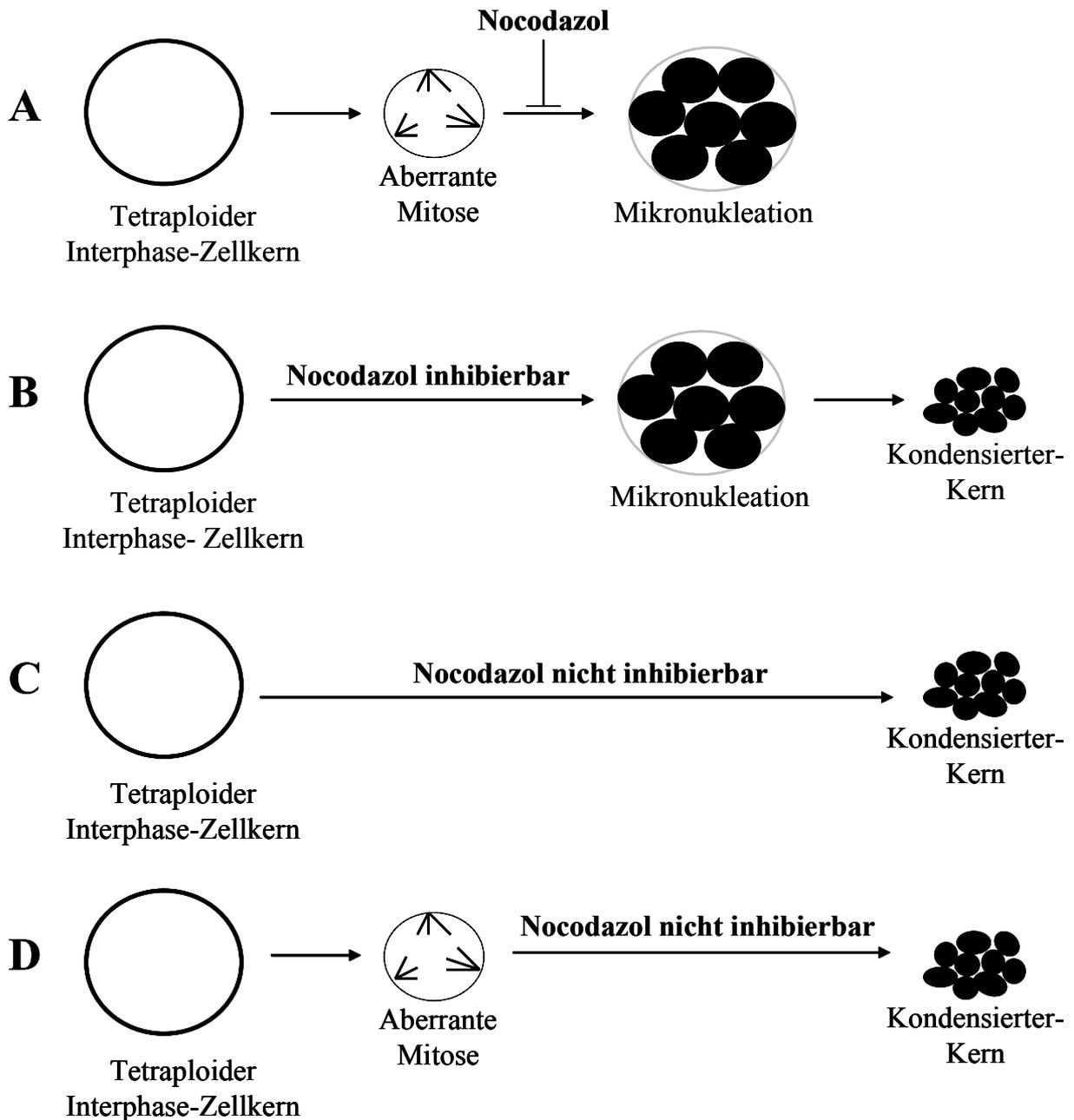


Fig. 17: Hypothetisches Schema der Konversion der Zellkernformen untereinander

**A:** Konversion vom tetraploiden Interphase-Zellkern über aberrante Mitosen zu Mikronukleationen.  
**B:** Tetraploider Interphase-Zellkern konvertiert über Mikronukleation zum kondensierten Kern.  
**C:** Konversion vom tetraploiden Interphase-Zellkern zum kondensierten Kern. **D:** Tetraploider Interphase-Zellkern konvertiert über aberrante Mitose zum kondensierten Kern.

Somit sprechen die Ergebnisse für folgende Kernkonversionsschritte (Fig. 17):

- A) Mitosen zu Mikronukleationen (Fig. 16), inhibierbar durch Nocodazol
- B) Interphasen zu Mikronukleationen (Fig. 16), inhibierbar durch Nocodazol
- C) Interphasen zu kondensierten Kernen (Fig. 16), nicht inhibierbar durch Nocodazol
- D) Mitosen zu kondensierten Kernen (Fig. 16), nicht inhibierbar durch Nocodazol

In der Arbeitsgruppe beobachtete Konversionsschritte:

- B) Mikronukleationen zu kondensierten Kernen (M. R. Bhone, Filmaufnahme; die HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen wurden nach SN-38 Behandlung über 24–48 Stunden lang beobachtet und zusätzlich in kurzen Abständen fotografiert.)
- C) Interphasen über Mikronukleationen zu kondensierten Kernen (M. R. Bhone, *shake off*-Experiment; die HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen wurden nach SN-38 Behandlung von den sich entwickelnden tetraploiden Interphasen mittels heftigen Schüttelns getrennt und neu ausgesät. 72 Stunden nach Behandlungsbeginn entstanden kondensierte Kerne und überwiegend Mikronukleationen. 96 Stunden nach Behandlungsbeginn überwog der Prozentsatz der kondensierten Kerne.)
- D) Mitosen zu kondensierten Kernen (M. R. Bhone, *shake off*-Experiment; die HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen wurden wie unter C) behandelt. Die entstandenen Mitosen wurden mittels heftigen Schüttelns getrennt und neu ausgesät. 72 Stunden nach Behandlungsbeginn entstanden kondensierte Kerne und Mikronukleationen zu einem ähnlichen Prozentsatz. 96 Stunden nach Behandlungsbeginn überwog der Prozentsatz der kondensierten Kerne). Interphasen zu Mitosen kann als Normalfall angenommen werden.

Aufgrund der Inhibition der SN-38-induzierten Mikronukleation, aber nicht der SN-38-induzierten Apoptose durch Nocodazol kann man schlussfolgern, dass die Mitose-unabhängige Apoptose vor und die Mikronukleation nach der Prometaphase stattfindet (Fig. 18).

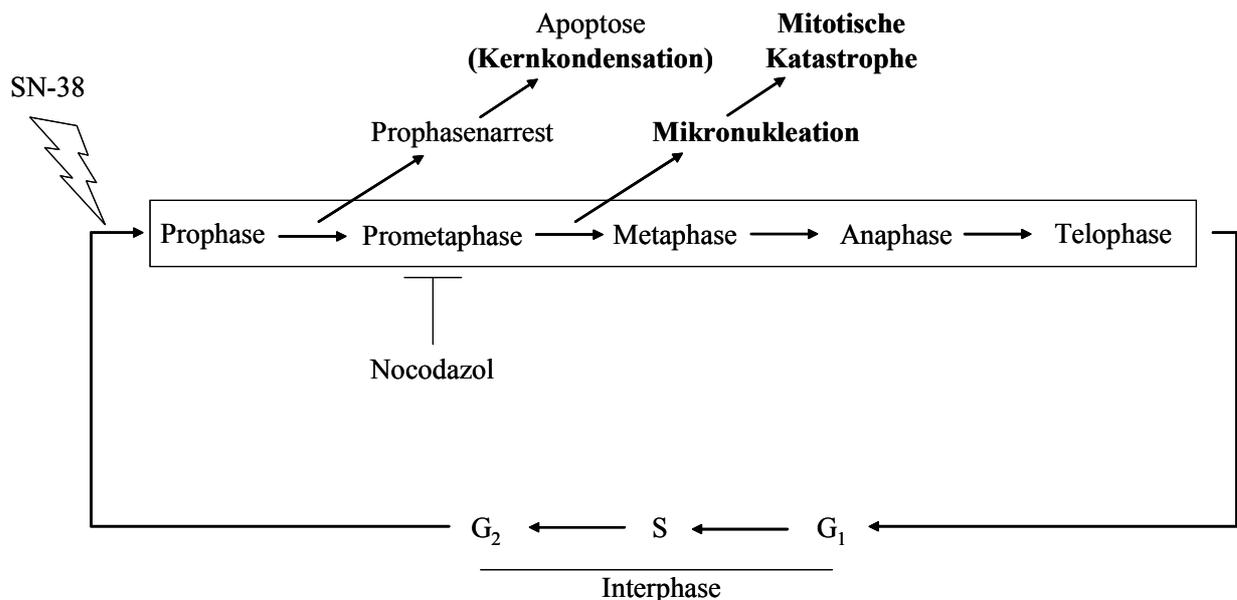


Fig. 18: Schematische Darstellung des Zellzyklus und des Ausgangs der Apoptose und der mitotischen Katastrophe [158] (Modifiziert)

Die SN-38-induzierte Apoptose findet vor und die Entscheidung zur mitotischen Katastrophe nach der Prometaphase statt. Nocodazol arretiert die Zellen in Prometaphase. Kasten: Mitose.

Aus den beobachteten Kernformen und den Kernkonversionsschritten folgt, dass die mitotische Katastrophe mindestens vier Kernformen aufweist (Interphasen, aberrante Mitosen, Mikronukleation und kondensierte Kerne), die ineinander übergehen, und dass sie mit der Apoptose endet (Fig. 19).

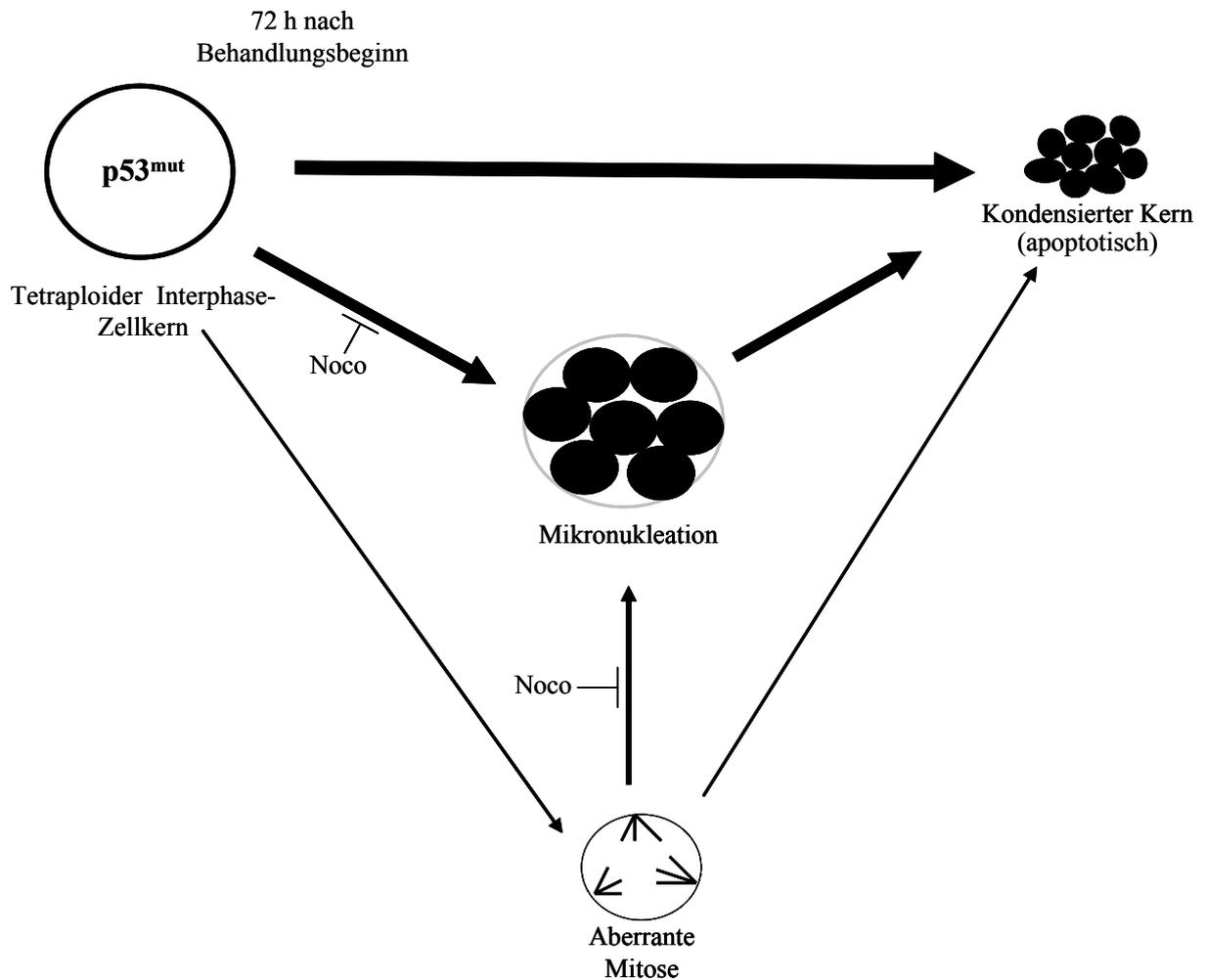


Fig. 19: Zusammenfassung von Fig. 21 als schematische Darstellung der Kernkonversionen nach Behandlung der  $p53^{mut}$ -Kolonkarzinomzellen mit SN-38

Die Dicke der Pfeile symbolisiert die Häufigkeit der Konversionen. Noco: Nocodazol

Das aufgrund der Daten entworfene Schema der Kernkonversion spricht dafür, dass die kondensierten (apoptotischen) Kerne auf zwei Wegen entstehen:

- a. hauptsächlich durch unmittelbare Konversion der tetraploiden Kerne bzw. mit den Zwischenstufen der Mikronukleation (klassische Apoptose)
- b. auf dem Umweg über aberrante Mitosen (Nebenweg), der als mitotische Katastrophe bezeichnet wird

Beide Wege sind  $p53$ -unabhängig und enden in Apoptose.

---

## **2. Untersuchung zur Regulation von Cyclin D1 bzw. hMps1-Kinase nach Behandlung der Kolonkarzinomzellen mit SN-38**

### 2.1. Protein-Expression von Cyclin D1 bzw. von hMps1 entspricht der RNA-Expression

Ein Mitarbeiter der AG, M. R. Bhonde, untersuchte fünf p53<sup>mut</sup>- und fünf p53<sup>wt</sup>-Kolonkarzinomzelllinien und behandelte sie mit SN-38 (10 nM für 48 Stunden) (M. R. Bhonde, Dissertation 2005, Charité). Er fand mittels Oligonukleotid-Arrays (Affymetrix), dass 96 Stunden nach Beginn der Behandlung die Cyclin-D1-mRNA in allen untersuchten p53<sup>wt</sup>-Zellen hochreguliert und in allen untersuchten p53<sup>mut</sup>-Zellen supprimiert wird. Dagegen war die hMps1-Kinase-mRNA in allen untersuchten p53<sup>wt</sup>-Zellen supprimiert und in allen untersuchten p53<sup>mut</sup>-Zellen hochreguliert. Ich untersuchte mittels Western Blot, ob dies auf Proteinebene auch der Fall ist.

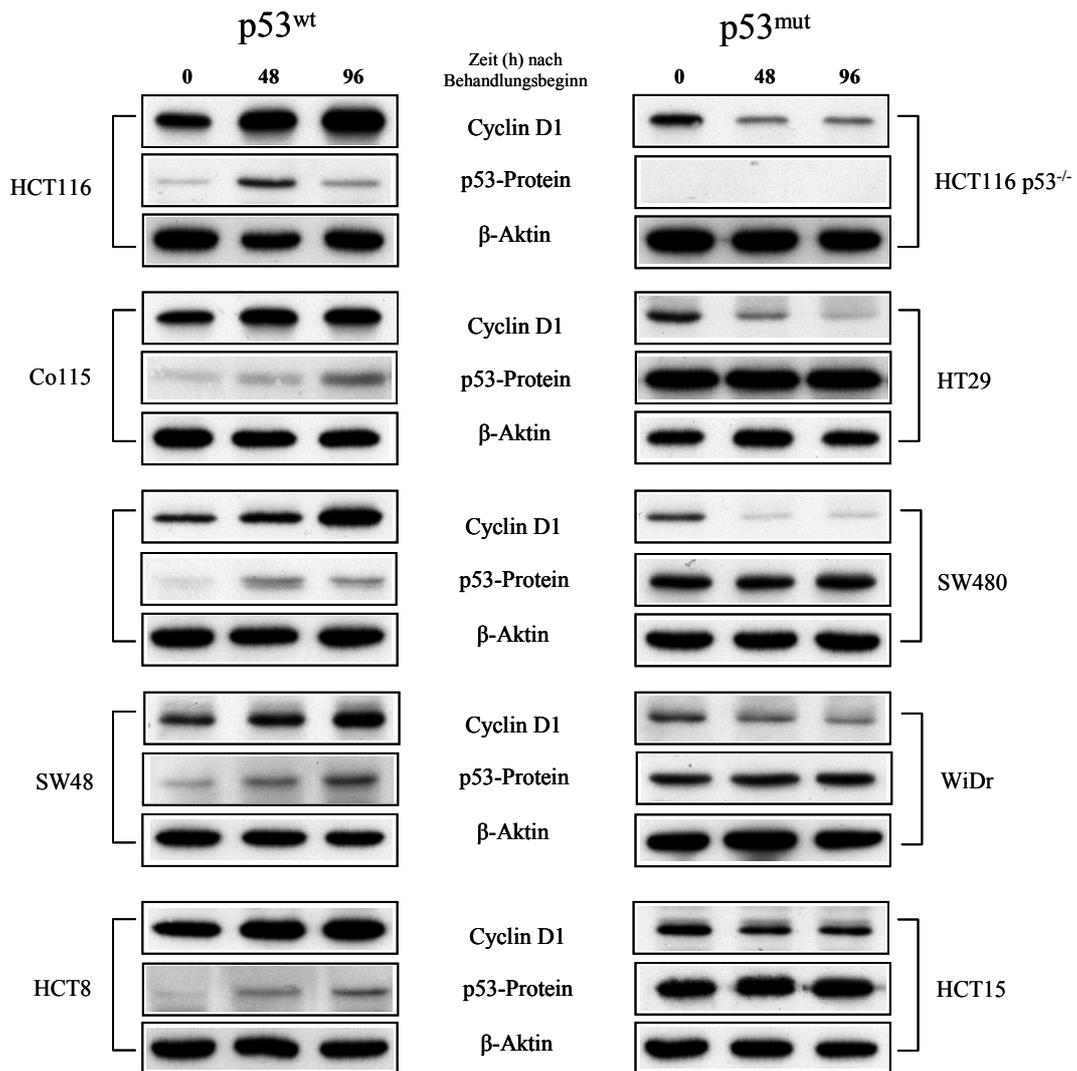


Fig. 20: Einfluss der SN-38-Behandlung auf die Cyclin-D1-Expression in  $p53^{wt}$ - und  $p53^{mut}$ -Zellen  
 Expression von Cyclin D1 und p53-Protein nach Behandlung von  $p53^{wt}$ - und  $p53^{mut}$ -Zellen mit SN-38 zum Zeitpunkt 48 und 96 Stunden nach Behandlungsbeginn.  $\beta$ -Aktin wurde detektiert, um die Gleichheit der Mengen von Proteinen in jeder Bahn zu überprüfen. Die Resultate sind repräsentativ für drei Experimente.

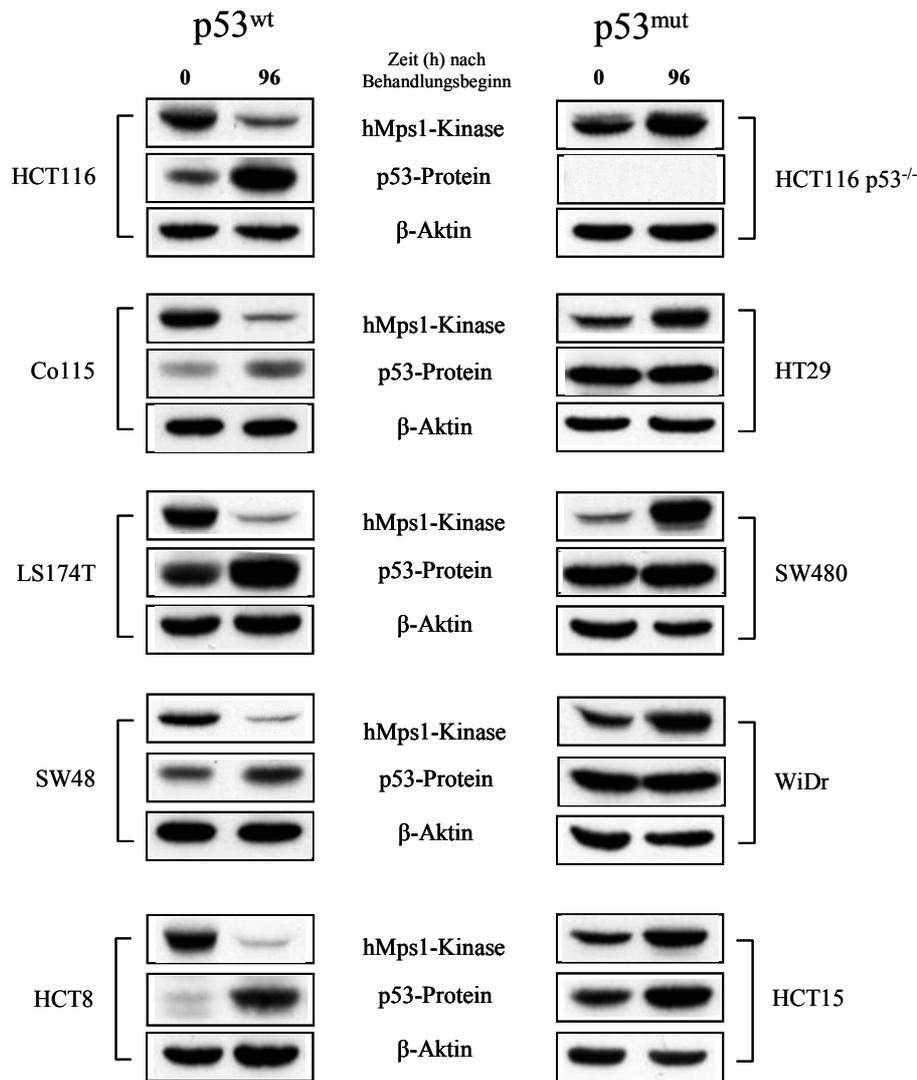


Fig. 21: Einfluss von SN-38-Behandlung auf die hMps1-Kinase-Expression in  $p53^{wt}$ - und  $p53^{mut}$ -Zellen  
 Expression von hMps1 und p53-Protein nach Behandlung von  $p53^{wt}$ - und  $p53^{mut}$ -Zellen mit SN-38 zum Zeitpunkt 96 Stunden nach Behandlungsbeginn. Es wurden nur adhärenzte Zellen genommen.  $\beta$ -Aktin wurde detektiert, um die Gleichheit der Mengen von Proteinen in jeder Bahn zu überprüfen. Die Resultate sind repräsentativ für drei Experimente.

Die Cyclin-D1-Proteinexpression wird nach SN-38-Behandlung in allen untersuchten  $p53^{wt}$ -Zellen hochreguliert und in allen untersuchten  $p53^{mut}$ -Zellen supprimiert (Fig. 20). Dagegen ist nach Behandlung mit SN-38 die hMps1-Kinase in allen untersuchten  $p53^{wt}$ -Zellen supprimiert und in allen untersuchten  $p53^{mut}$ -Zellen hochreguliert (Fig. 21).

Die Proteinexpression von Cyclin D1 und hMps1-Kinase im Western Blot bestätigt und erweitert somit die mittels Oligonukleotid-Arrays erhaltenen Resultate.

## 2.2. Versuch der Regulation von Cyclin D1 bzw. von hMps1-Kinase durch das Plasmid-kodierte p53-Protein

Xinbin Chen [159] zeigte, dass Cyclin D1 von dem p53-Protein und dessen Zielprotein p21 transkriptionell reguliert wird. Ich überprüfte diesen Befund in einem isogenen System, indem ich ein für das p53-Protein kodierendes Plasmid in HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen transfizierte und Cyclin D1 detektierte. Gleichzeitig wurde die hMps1-Expression überprüft.

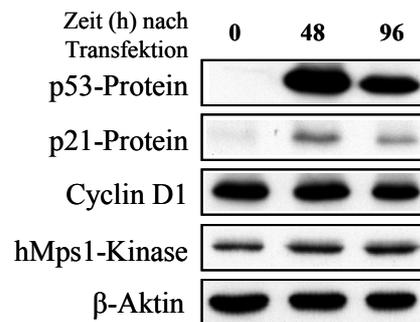


Fig. 22: Einfluss von p53-Überexpression in HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen auf die Expression von Cyclin D1 und hMps1-Kinase

Die Western-Blot-Analyse zeigt die Expression der Proteine p53, p21, Cyclin D1 und hMps1 nach Transfektion der HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen mit einem für p53-Protein kodierenden Plasmid (1 ng/μl). Nur adhärenente Zellen wurden verwendet. β-Aktin wurde detektiert, um die Gleichheit der Mengen von Proteinen in jeder Bahn zu überprüfen. Die Resultate sind repräsentativ für jeweils drei Experimente.

Das p53-Protein wurde nach Transfektion mit einem Plasmid exprimiert. Als Maß der transkriptionellen Aktivität von p53 wurde die Expression von p21 gemessen. Es zeigte sich, dass das Expressionsmaximum des p21-Proteins, wie beim p53-Proteins, bei 48 Stunden nach Transfektion lag. Dies wies darauf hin, dass das durch das Plasmid transfizierte p53-Protein transkriptionell aktiv war. Trotzdem änderte sich die Expression des Cyclin D1 und der hMps1-Kinase nicht signifikant.

Die vorläufige Schlussfolgerung war, dass das exogene p53-Protein funktionsfähig ist, jedoch möglicherweise alleine weder Cyclin D1 noch hMps1-reguliert. Deshalb untersuchte ich, ob die Regulation dieser beiden Proteine nur nach DNA-Schädigung stattfindet, indem ich das exogene p53-Protein in HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen exprimierte und sie mit SN-38 behandelte.

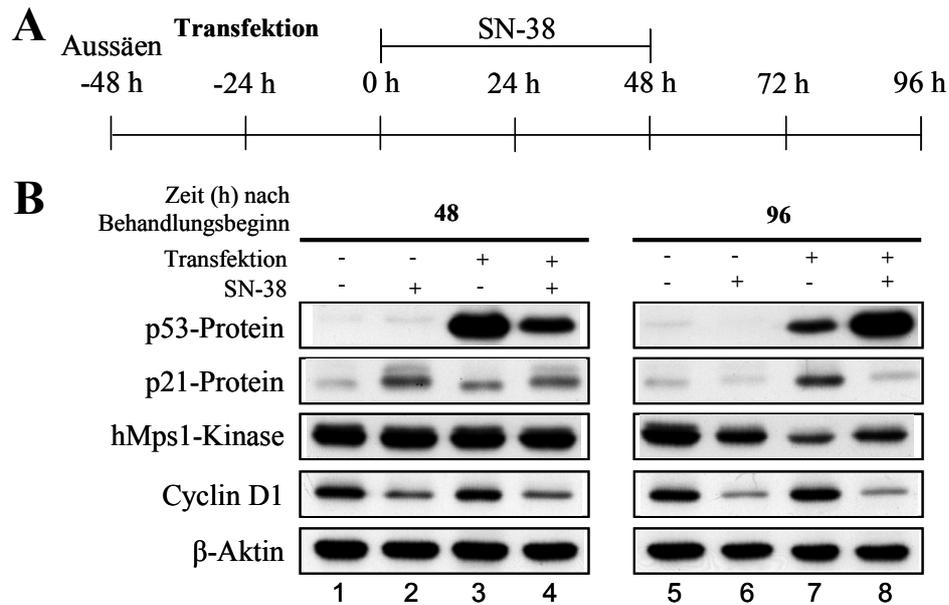


Fig. 23: Einfluss der p53-Überexpression nach SN-38-Behandlung auf die Expression von Cyclin D1 und hMps1-Kinase

**A:** Versuchsprozedur **B:** Western-Blot-Analyse zeigt die p53-Protein-, p21-Protein-, Cyclin-D1- und hMps1-Expression nach Transfektion der HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen mit einem für p53-Protein kodierenden Plasmid und SN-38-Behandlung. Zeitpunkt 48 und 96 Stunden nach Behandlungsbeginn. Verwendet wurden nur adhärenzte Zellen. Um die Gleichheit der Mengen in jeder Bahn zu überprüfen, wurde β-Aktin detektiert. Die Resultate sind repräsentativ für drei Experimente.

Das p53-Protein wurde nach Transfektion exprimiert und erwies sich auch als funktionsfähig (Fig. 23, p21-Proteinexpression in der Bahn 3 und 7). Cyclin D1 und die hMps1-Kinase veränderten sich jedoch nicht signifikant, auch nicht nach Behandlung mit SN-38. Daraus wurde gefolgert, dass das Plasmid-kodierte p53-Protein nicht ausreichend aktiv ist, um signifikante Veränderungen der Cyclin-D1- bzw. hMps1-Kinase-Expression zu verursachen. Alternativ müsste die Hypothese der hMps1-Regulation durch p53 falsch sein.

### 2.3. Versuch der Regulation von Cyclin D1 bzw. hMps1-Kinase durch das Adenovirus-kodierte p53- bzw. p21-Protein

Um die endogene p53-Aktivität mit der Aktivität des exogenen p53-Proteins zu vergleichen, habe ich die HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen mit SN-38 behandelt und mit einem für p53-Protein kodierenden Plasmid transfiziert. Ergänzend wurden auch HCT116-Zellen mit SN-38 behandelt. Zusätzlich wurde ein für p53-Protein kodierender Adenovirus von Dr. Gillissen (AG Dr. Daniel MDC-Berlin) in die Zelllinie HCT116 p53<sup>-/-</sup> transduziert. Zum Vergleich wurde ein LacZ-exprimierender Adenovirus verwendet. Die Zellysate wurden auf eine Membran geblotet, um die transkriptionelle Aktivität von p53-Protein in den einzelnen Proben zu vergleichen. Als Maß der Aktivität wurde die Expression von p21-Protein gemessen.

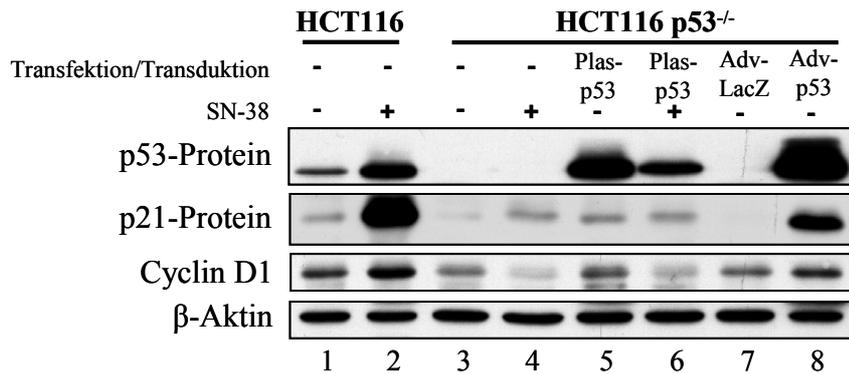


Fig. 24: Vergleich der p53-Transkriptionsaktivität in verschiedenen Systemen (Bahn 2 vs. Bahn 5, 6 und 8) in den Zelllinien HCT116 und HCT116 p53<sup>-/-</sup>

Expression der Proteine p53, p21 und Cyclin D1 nach SN-38 Behandlung in HCT116-Zellen und nach SN-38-Behandlung, nach Transfektion eines für p53-Protein kodierenden Plasmids und nach Transduktion mit einem adenoviralen Vektor, kodierend für p53-Protein (25 MOI) in HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen. Nur adhärenente Zellen wurden verwendet. Plas: Plasmid, Adv: Adenovirus.

Das p53-Protein wurde nach Transfektion mit einem für p53-Protein kodierenden Plasmid und nach Transduktion mit einem für p53-Protein kodierenden Adenovirus exprimiert (Fig. 24, Bahn 5 und 8). Es zeigte sich an der p21-Expression, dass das endogene p53-Protein in HCT116-Zellen nach SN-38-Behandlung vielfach aktiver war als das transfizierte Plasmid-kodierte p53-Protein in HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen (Fig. 24, Bahn 2 vs. 5). Dies unterstützt die unter Punkt 2.2 auf Seite 59, letzter Absatz formulierte Hypothese. Das Adenovirus-kodierte p53-Protein im Vergleich zum endogenen p53-Protein war circa halb so aktiv (Fig. 24, Bahn 8 vs. 2). Diese Aktivität war ausreichend, um Cyclin D1 hochzuregulieren (Fig. 24, Bahn 7 vs. 8).

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die Expression von Proteinen p53, p21 und Cyclin D1 mittels Western Blot in den mit Adenovirus-transduzierten Zellen bei einer Infektionsmultiplizität (MOI) von 25 untersucht. Zum Vergleich wurde ein LacZ-exprimierendes Adenovirus verwendet.

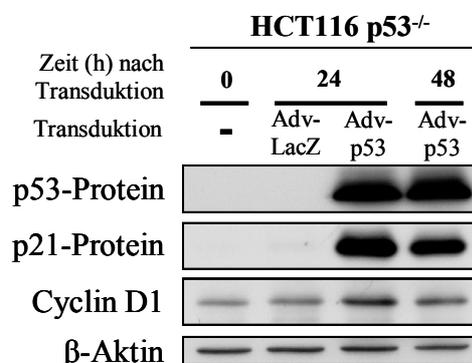


Fig. 25: Einfluss der p53-Überexpression in den HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen auf Cyclin-D1-Expression

Die Proteinexpression von p53, p21 und Cyclin D1 nach Transduktion (MOI von 25) der HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen mit einem für p53-Protein kodierenden Adenovirus. Es wurden nur adhärenente Zellen verwendet. Die Resultate sind repräsentativ für zwei Experimente.

Das p53-Protein wurde nach Transfektion mit einem p53-Protein kodierenden Adenovirus exprimiert und war auch funktionsfähig, da die p21-Proteinexpression nach Transduktion anstieg. Nach Transduktion stieg die Cyclin-D1-Expression an. Daraus folgte, dass Cyclin D1 durch p53-Protein hochreguliert werden konnte.

Um zu untersuchen, ob das p21-Protein für die Cyclin-D1-Hochregulation notwendig war, benutzte ich die HCT116-p21<sup>-/-</sup>-Zelllinie, die mit dem für p53-Protein kodierenden Adenovirus transduziert wurde. Zusätzlich wurde auch die Zelllinie HCT116 p53<sup>-/-</sup> mit einem für p21-Protein kodierenden Adenovirus transduziert.

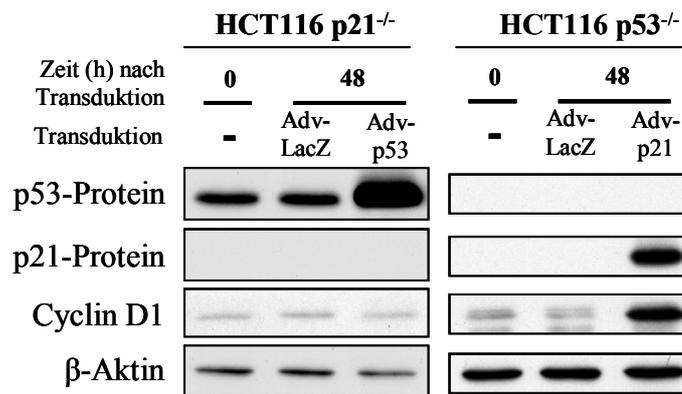


Fig. 26: Einfluss von p21 auf die p53-vermittelte Cyclin-D1-Expression

Expression der Proteine p53, p21 und Cyclin D1 nach Transduktion (MOI von 25) der HCT116-p21<sup>-/-</sup>-Zellen mit einem für p53-Protein kodierenden Adenovirus und nach Transduktion (MOI von 20) der HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen mit einem für p21-Protein kodierenden Adenovirus. Verwendet wurden nur adhärenzte Zellen. Die Resultate sind repräsentativ für zwei Experimente.

Nach Transduktion mit dem adenoviralen Vektor, kodierend für das p53- bzw. p21-Protein, konnte jeweils das entsprechende Protein exprimiert werden. Nach der Überexpression von p53-Protein in HCT116-p21<sup>-/-</sup>-Zellen, d. h. in Abwesenheit von p21-Protein, veränderte sich die Cyclin-D1-Proteinexpression nicht. Erstaunlicherweise wird nach Überexpression von p21-Protein in HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen, d. h. in Abwesenheit von p53, Cyclin D1 hochreguliert.

Dieses überraschende Ergebnis spricht dafür, dass p21-Protein notwendig ist, um Cyclin D1 hochzuregulieren und dass p21-Protein auch alleine Cyclin D1 hochregulieren kann.

Um zu untersuchen, ob mit steigender MOI bzw. mit steigender p53-Überexpression eine verstärkte Veränderung der Cyclin-D1- bzw. hMps1-Kinase-Expression stattfindet, benutzte ich die HCT116- und HCT116-p21<sup>-/-</sup>-Zelllinien, die mit dem für p53-Protein kodierenden Adenovirus transduziert wurden. Dazu analysierte ich die Proteinexpression von p53, p21, Cyclin D1 und hMps1-Kinase mittels Western Blot bei unterschiedlicher Infektionsmultiplizität (MOI). Zum Vergleich wurde ein LacZ-exprimierendes Adenovirus verwendet.

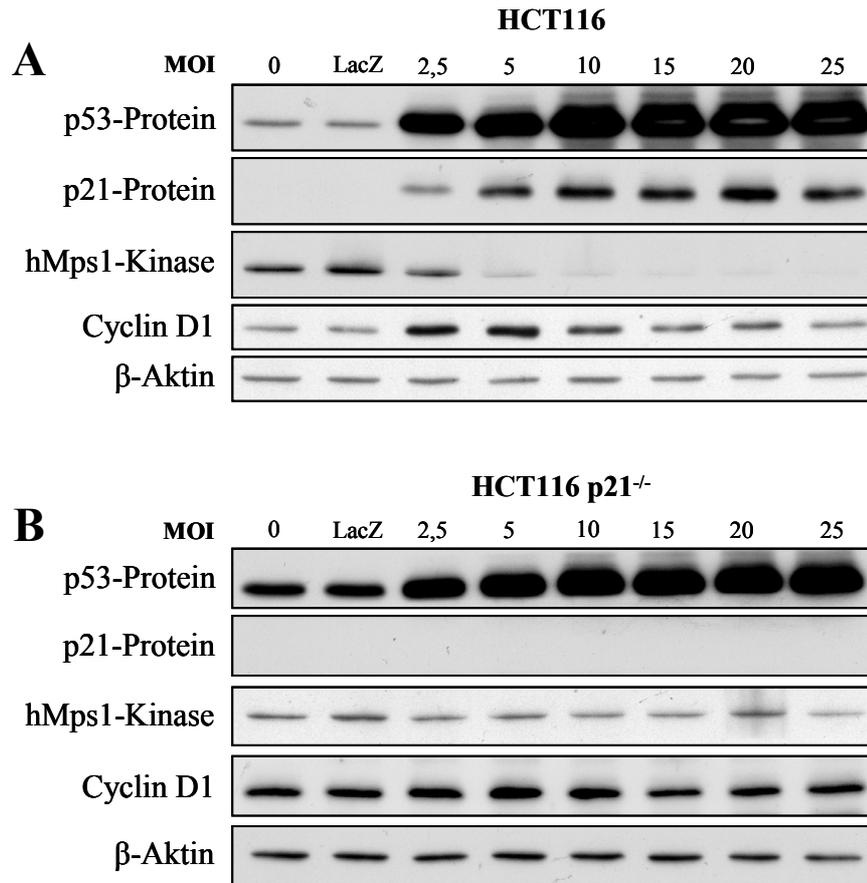


Fig. 27: Einfluss von p53-Überexpression auf die Expression von Cyclin D1 und hMps1-Kinase in den Zelllinien HCT116 und HCT116 p21<sup>-/-</sup>

Proteinexpression von p53, p21, Cyclin D1 und hMps1 nach Transduktion der HCT116- (A) und der HCT116-p21<sup>-/-</sup>-Zellen (B) mit einem für p53-Protein kodierenden Adenovirus bei verschiedener MOI (2,5, 5 10, 15, 20 und 25). Nur adhärenente Zellen wurden verwendet. Die Resultate sind repräsentativ für zwei Experimente.

Nach Transduktion mit einem adenoviralen Vektor, kodierend für p53-Protein, wurde in beiden Zelllinien p53-Protein exprimiert, und es erwies sich auch als funktionsfähig, da mit steigender MOI die Expression von p21-Protein in der HCT116-Zelllinie zunahm (Fig. 27 A). p21-Protein war wie erwartet in der HCT116-p21<sup>-/-</sup>-Zelllinie abwesend (Fig. 27 B).

In Anwesenheit von p21-Protein und mit steigender MOI wurde die hMps1-Kinase-Expression stark supprimiert (Fig. 27 A). Dagegen wurde in Abwesenheit von p21-Protein die hMps1-Kinase-Expression nur sehr leicht supprimiert (Fig. 27 B). Daraus folgt, dass p21-Protein die p53-vermittelte Suppression von hMps1-Kinase verstärkt.

In HCT116-Zellen, also in Anwesenheit von p21-Protein, hatte Cyclin D1 sein Expressionsmaximum bei 5 MOI und fiel mit weiter steigenden MOI wieder auf Basisniveau (Fig. 27 A). Die Cyclin-D1-Expression änderte sich in Abwesenheit von p21-Protein nicht (Fig.

27 B). Dies bestätigte die Schlussfolgerung, dass p21-Protein notwendig ist, um Cyclin D1 hochzuregulieren (Fig. 26).

Da bei 20 MOI nach Transduktion mit dem für p21-Protein kodierenden Adenovirus Cyclin D1 hochreguliert werden konnte, untersuchte ich, bei welcher MOI mit einem adenoviralen Vektor, kodierend für p53-Protein, die gleiche p21-Proteinexpression detektiert werden kann. Ich verglich die p21-Proteinexpression nach Transduktion der HCT116-Zellen mit einem für p53-Protein kodierenden Adenovirus bei unterschiedlicher MOI (5, 15 und 25) mit der Transduktion der HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen mit einem für p21-Protein kodierenden Adenovirus bei 20 MOI.

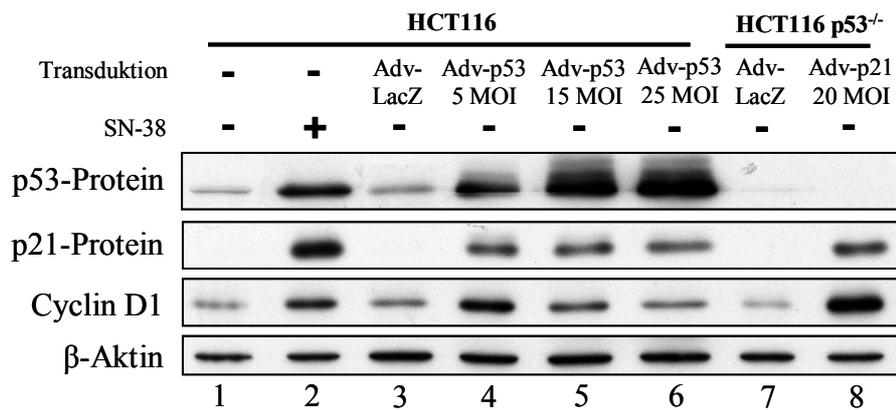


Fig. 28: Vergleich der p21-Überexpression mit der p53-vermittelten p21-Expression (Bahn 8 vs. 2, 4, 5 und 6)

Expression der Proteine p53, p21 und Cyclin D1 nach Transduktion der HCT116-Zellen mit einem für p53-Protein kodierenden Adenovirus (bei 5, 15 und 25 MOI) und nach Behandlung mit SN-38 sowie nach Transduktion der HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen mit einem adenoviralen Vektor, kodierend für p21-Protein (20 MOI). Nur adhärenente Zellen wurden benutzt und 10 µg Proteine pro Bahn aufgetragen.

Die p21-Proteinexpression bei 20 MOI Adv-p21 (bei der Cyclin D1 hochreguliert wurde) entspricht einer p53-vermittelten p21-Proteinexpression bei 5 MOI Adv-p53 (Fig. 28, Bahn 8 vs. 4). Cyclin D1 ist bei 5 MOI Adv-p53 maximal exprimiert. Das heißt, dass nur 5 MOI für die Transduktion mit dem p53-Protein kodierten Adenovirus (Adv-p53) ausreichen, um eine physiologische Konzentration von p21 zu erhalten, die Cyclin D1 hochregulieren. Diese Funktion von p21 war noch nicht bekannt.

Um zu untersuchen, ob die Regulation von Cyclin D1 über p21-Protein auch auf mRNA-Ebene stattfindet, wurde p21 in den HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen überexprimiert und Cyclin D1-mRNA mittels RT-PCR bestimmt.

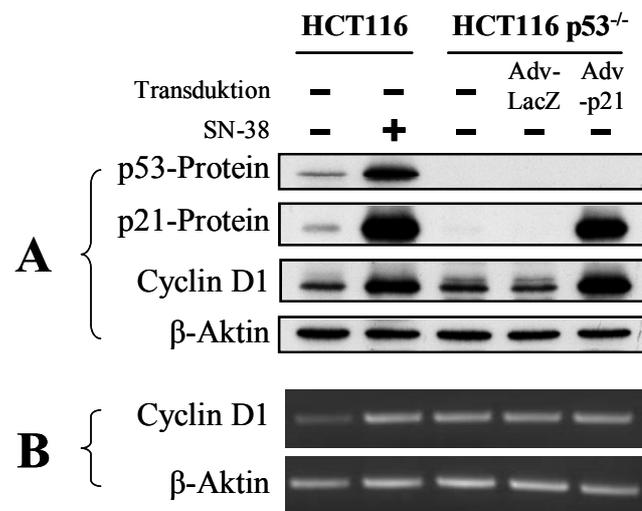


Fig. 29: Einfluss der p21-Proteinexpression auf die Cyclin-D1-mRNA- bzw. Proteinexpression. Protein-Expression von p53, p21 und Cyclin D1 (**A**) und mRNA-Expression von Cyclin D1 (**B**) nach Transduktion (20 MOI) mit dem adenoviralen Vektor, kodierend für p21-Protein, nach 48 Stunden nach Transduktion. Die Resultate sind repräsentativ für zwei Experimente.

Nach p21-Überexpression wurde Cyclin D1 auf Protein- (Fig. 29 A), aber nicht auf mRNA-Ebene (Fig. 29 B) exprimiert. Cyclin D1 wird somit nur auf Protein- und nicht auf mRNA-Ebene über p21 hochreguliert. Dies steht im Gegensatz zu den Proteinen hMps1 und Hec1, die auf beiden Ebenen von p21 reguliert werden (M. R. Bhone, Dissertation 2005, Charité).

#### 2.4 Untersuchung der potenziellen Rolle von STAT-3 in der Cyclin-D1-Regulation

Der Transkriptionsfaktor STAT3 kann Cyclin D1 hochregulieren [160] in Maus-Fibroblasten [161], in humanen Myeloma-Zelllinien [162] und in humanen Kolorektalkarzinomzelllinien [163, 164]. Um zu untersuchen, ob dies in meinem isogenen System auch der Fall ist, behandelte ich die HCT116- und die HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen mit SN-38 (10 nM für 48 h) und analysierte die Expression des aktiven STAT-3 sowie von Cyclin D1 im Western Blot.

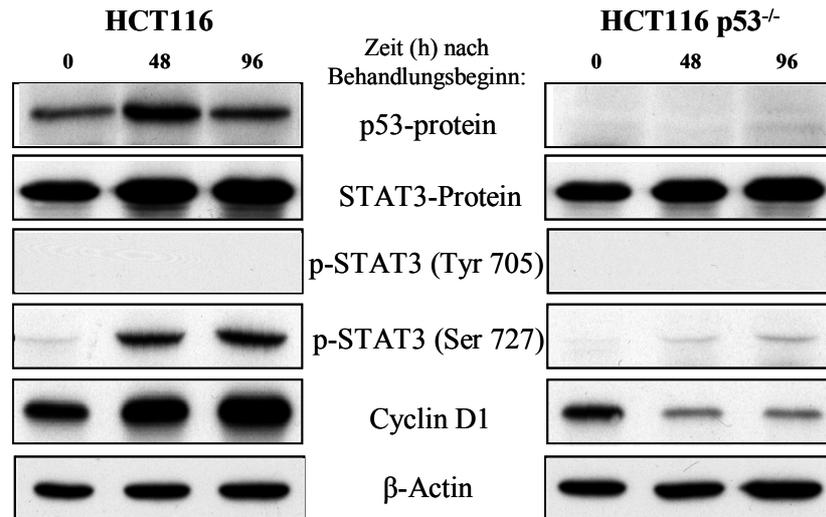


Fig. 30: *Einfluss von SN-38-Behandlung auf STAT-3 und Cyclin D1*

Expression des STAT-3-Proteins, sein Phosphorylierungsstatus (Ser 727 und Tyr 705) und die Proteinexpression von Cyclin D1 in HCT116- und HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen nach SN-38-Behandlung. β-Aktin wurde detektiert, um die Gleichheit der Mengen von Proteinen in jeder Bahn zu überprüfen. Die Resultate sind repräsentativ für zwei Experimente.

Die STAT-3-Protein-Expression ist in beiden Zelllinien nach Behandlung unverändert. STAT-3 ist nicht an der Stelle Tyr 705 phosphoryliert und somit transkriptionell inaktiv. Es ist aber unterschiedlich an der Stelle Ser 727 phosphoryliert. Die transkriptionelle Aktivität von STAT-3 geht nicht mit der Cyclin-D1-Protein-Expression einher.

---

### **3. Einfluss von hMps1-Kinase bzw. Cyclin D1 auf den Verlauf der mitotischen Katastrophe**

#### 3.1. hMps1-Kinase hat keinen Einfluss auf die Zentrosomenzahl nach SN-38 Behandlung

M. R. Bhonde beobachtete, dass nach SN-38-Behandlung hMps1-Kinase in HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen hochreguliert wird. Wiley [165] und Liu [150] entdeckten, dass die Überexpression von hMps1-Kinase die Zentrosomenamplifikation auslöst. Somit könnte Zentrosomenamplifikation ein Schritt der mitotischen Katastrophe darstellen. Ich untersuchte daher die Wirkung von SN-38 auf die Zentrosomenzahl. Ferner untersuchte ich, ob die Zentrosomenamplifikation mit der Apoptose einhergeht. Ich behandelte HCT116- und HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen mit SN-38 und stellte die Zentrosomen immunhistochemisch dar.

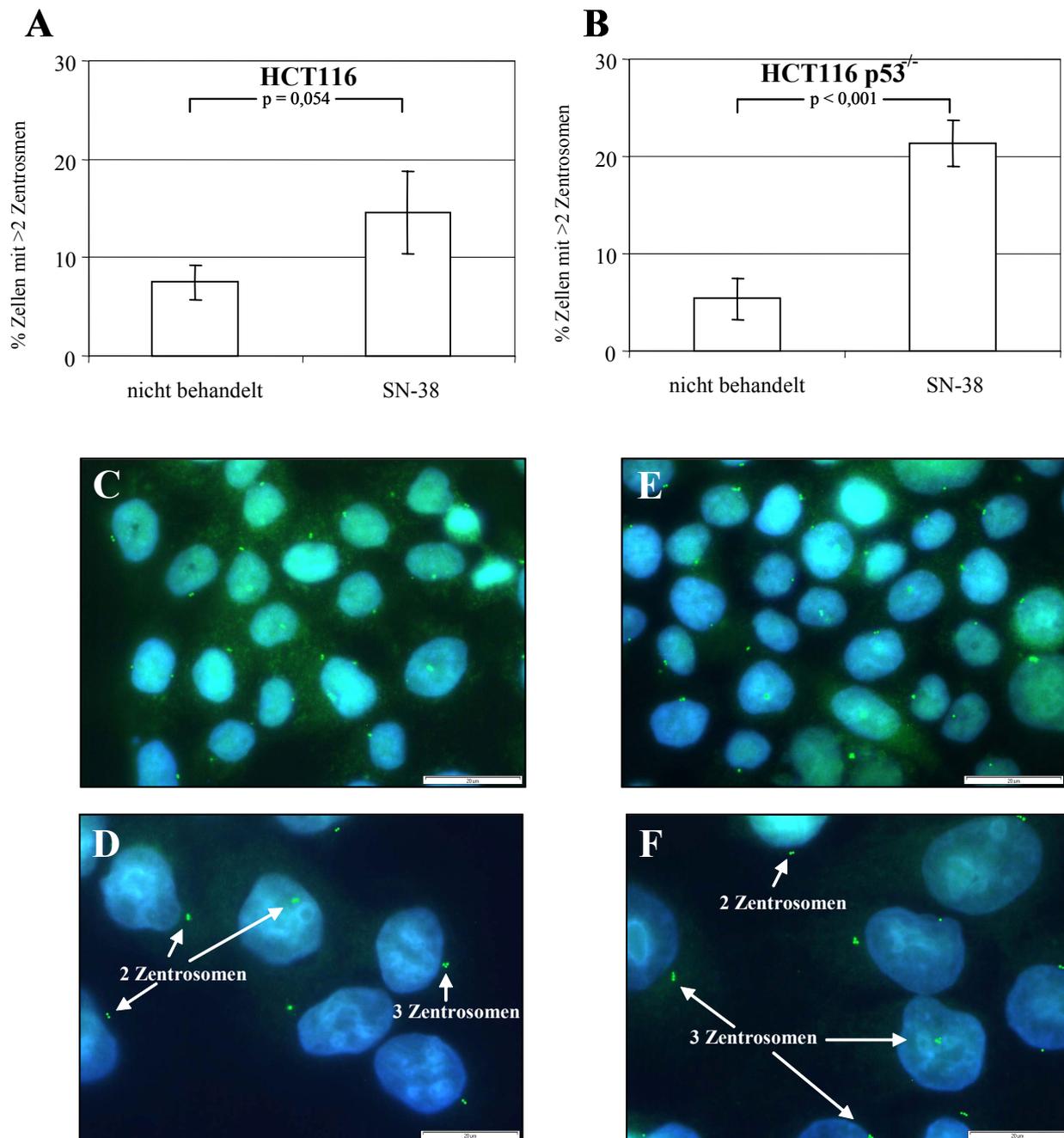


Fig. 31: SN-38-induziert Zentrosomenamplifikation in HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen

**A:** Prozentsatz der Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen nach SN-38-Behandlung in HCT116- und **B:** HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen. Mittelwerte von drei Experimenten  $\pm$  SD. **C:** Nichtbehandelte HCT116-Zellen. **D:** Mit SN-38 behandelte HCT116-Zellen. **E:** Nichtbehandelte HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen. **F:** Mit SN-38 behandelte HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen. Zellkernfärbung mit DAPI (blau) und Zentrosomenfärbung mit  $\gamma$ -Tubulin (grün). Weißer Balken 20 $\mu$ m.

SN-38 induziert 48 Stunden nach Behandlungsbeginn eine Zentrosomenamplifikation in HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen, aber nicht in HCT116-Zellen. Die Transfektion der HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen mit dem hMps1-Kinase kodierenden Plasmid sowie mit anderen Plasmiden (für p53 und Cyclin D1 kodierend) führte zur gleichen Zentrosomenamplifikation. Somit muss angenommen werden, dass dies ein unspezifischer Effekt war (Experiment durchgeführt von M. R. Bhonde). Daraus

wird gefolgt, dass Zentrosomenamplifikation präferentiell in  $p53^{-/-}$ -Zellen stattfindet (Fig. 31 A vs. B), aber nicht von hMps1 abhängig ist [151, 154]. Da die Amplifikation häufig in HCT116-Zellen vorkommt, ist sie offensichtlich nicht ausreichend, um eine mitotische Katastrophe auszulösen.

### 3.2. hMps1-Expression beeinflusst Apoptose

Um zu erfahren, welchen morphologischen Schritt der Kerntransformation die hMps1-Kinase beeinflusst, wurde diese mit siRNA nach SN-38-Behandlung supprimiert und die Kernformen sowie die Apoptosemarker ausgewertet.

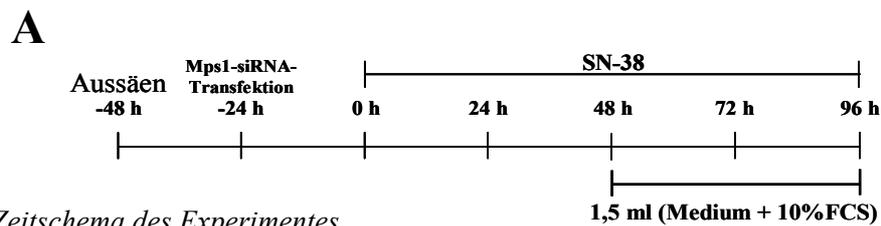


Fig. 36: (A) Zeitschema des Experimentes

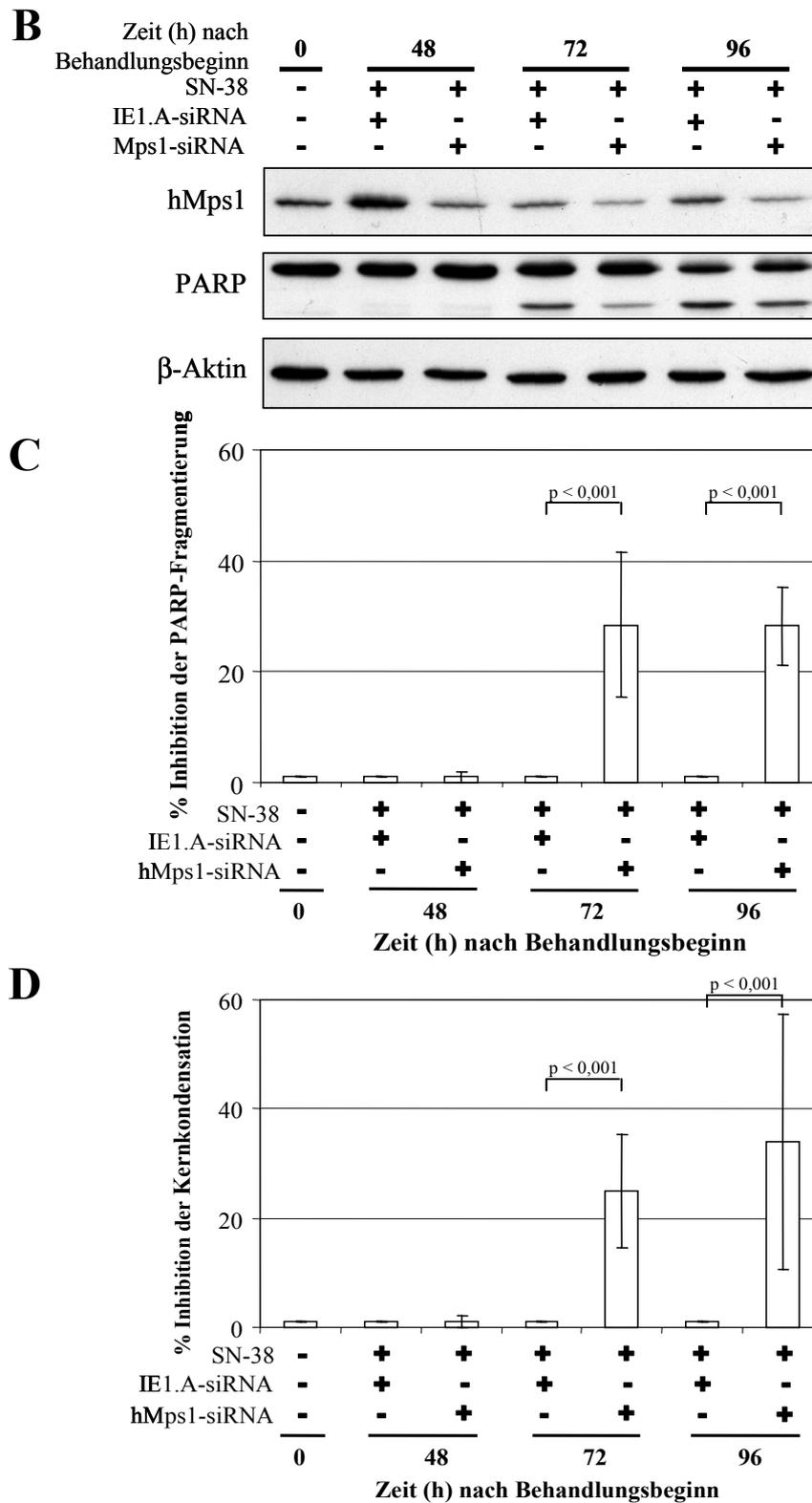


Fig. 32: (B-D) Einfluss der hMps1-Kinase-Suppression und der SN-38-Behandlung in HT-29-Zellen ( $p53^{mut}$ )

**B:** PARP-Fragmentierung in HT-29-Zellen ( $p53^{mut}$ ) nach siRNA-Transfektion (200 nM) und SN-38-Behandlung. IE-1A-siRNA wurde zur Kontrolle der Spezifität verwendet. 20  $\mu$ g Protein wurden in jeder Bahn geladen.  $\beta$ -Aktin wurde zur Kontrolle detektiert, um die Gleichheit der Mengen von Proteinen in jeder Bahn zu überprüfen. Resultate von sechs Experimenten. **C:** Prozentsatz der Inhibition der PARP-

Fragmentierung von **B** (mittels TINA-Programm). Mittelwerte von sechs Experimenten  $\pm$  SD. **D**: Prozentsatz der Inhibition der kondensierten Kerne nach morphologischer Auswertung. Mittelwerte von drei Experimenten  $\pm$  SD.

Nach hMps1-siRNA-Transfektion wurde hMps1-Kinase und die SN-38-induzierte PARP-Fragmentierung supprimiert (Fig. 32 B). Die Inhibition der PARP-Fragmentierung nach hMps1-siRNA-Transfektion ist signifikant (t-test,  $p < 0,001$ ) und beträgt 36 % zum Zeitpunkt 72 Stunden und 28 % zum Zeitpunkt 96 Stunden nach Behandlungsbeginn (Fig. 32 C). Morphologisch erhielt man nach hMps1-siRNA-Transfektion eine signifikante (t-test,  $p < 0,001$ ) Inhibition der Kondensation (Fig. 32 D). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die hMps1-Kinase-Expression nach DNA-Schädigung zur Entstehung der kondensierten Kerne und PARP-Fragmentierung beiträgt.

### 3.3. Cyclin D1 hat keinen Einfluss auf Apoptose

#### 3.3.1 Expression von Cyclin D1 kodierendem Plasmid in HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen

Um zu überprüfen, ob die Cyclin-D1-Expression die SN-38-induzierte Apoptose supprimieren kann, wurden HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen mit einem für Cyclin-D1-Protein kodierenden Plasmid transfiziert und die Expression im Western Blot untersucht.

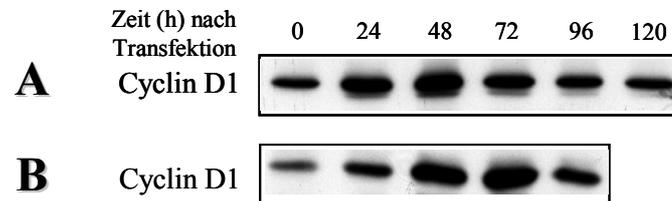


Fig. 33: *Cyclin-D1-Expression nach transientser Transfektion mit einem für Cyclin-D1-Protein kodierenden Plasmid*

Transfektion mit unterschiedlichen Mengen von Plasmid **A**: (1 ng/μl) **B**: (1,5 ng/μl)

Die maximale Cyclin-D1-Expression wurde 72 Stunden nach Transfektion mit 1,5 ng/μl Plasmid erreicht (Fig. 33 B).

Um zu überprüfen, ob die Cyclin-D1-Überexpression die DNA-schädigungsbedingte Apoptose in HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen supprimiert, wurden HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen mit einem Cyclin-D1-Plasmid transfiziert und mit SN-38 behandelt. Die PARP-Fragmentation wurde im Western Blot untersucht.

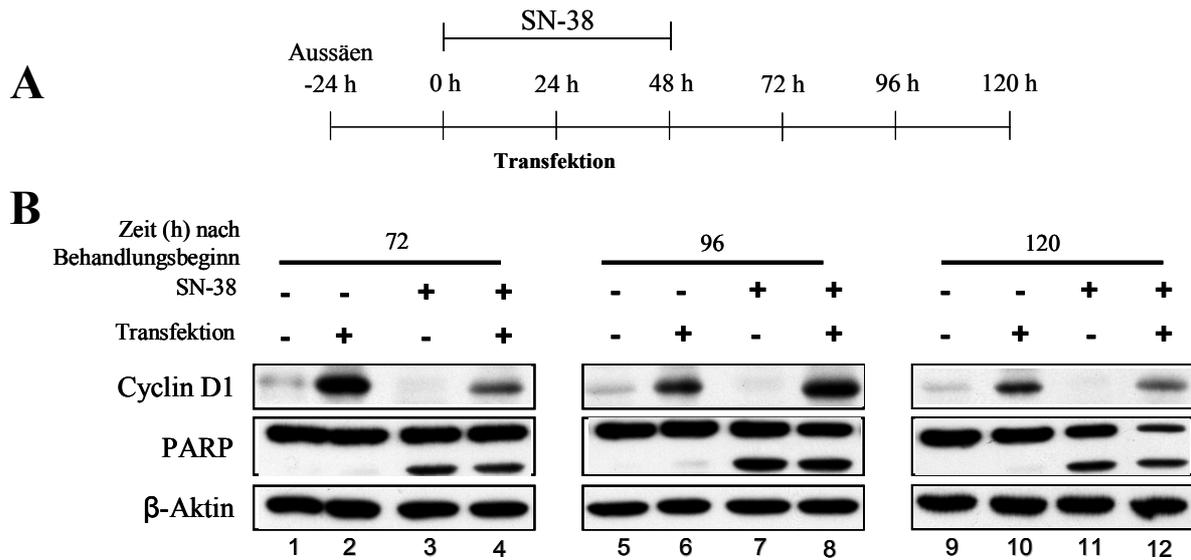


Fig. 34: *Einfluss der Cyclin-D1-Überexpression und SN-38-Behandlung auf die PARP-Fragmentierung*  
**A:** Zeitschema **B:** PARP-Fragmentierung und Cyclin-D1-Expression nach SN-38-Behandlung und nach Transfektion mit einem Plasmid (1,5 ng/μl) in HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen. Resultat ist repräsentativ für drei Experimente.

Die SN-38-induzierte Apoptose, detektierbar als PARP-Fragmentierung konnte nach Cyclin-D1-Überexpression nicht supprimiert werden (Fig. 34, Bahn 3 vs. 4, 7 vs. 8 und 11 vs. 12).

### 3.3.2 Optimierung der Suppression von Cyclin-D1-mRNA durch die siRNA

Um zu untersuchen, ob die Suppression von Cyclin D1 durch siRNA Apoptose induzieren kann, wurde zuerst die siRNA-Transfektion in SW480-Zellen standardisiert und mittels Western Blot überprüft.

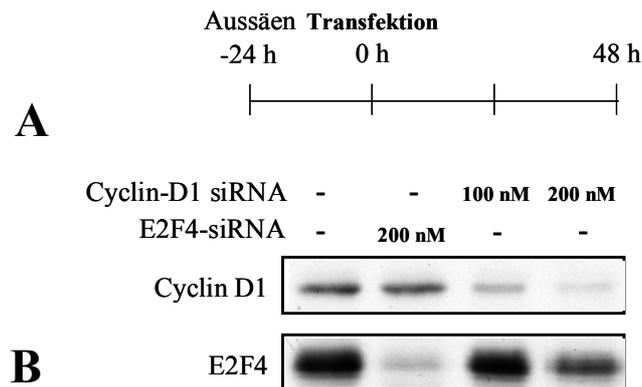


Fig. 35: *Suppression von Cyclin D1 durch siRNA in SW480*  
**A:** Zeitschema **B:** Cyclin-D1- und E2F4-Expression nach siRNA-Transfektion in SW480-Zellen zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Transfektion. E2F4 ist ein Transkriptionsfaktor und wurde hier zur Kontrolle der Suppressionspezifität verwendet.

Mit 200 nM Cyclin-D1-siRNA konnte eine Cyclin-D1-Suppression erzielt werden. E2F4-siRNA diente hier der Kontrolle der Spezifität: Die E2F4-Expression wurde fast vollkommen gehemmt, dessen Suppression hatte aber keinen Einfluss auf die Cyclin-D1-Expression.

Für weitere Versuche wurde die siRNA-Konzentration gesucht, bei der eine maximale Cyclin-D1-Suppression in HCT116-Zellen stattfindet.

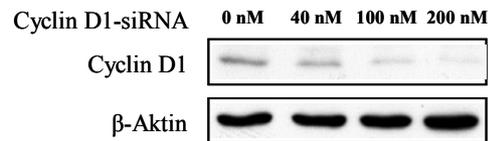


Fig. 36: *Abhängigkeit der Cyclin-D1-Suppression in HCT116-Zellen von der Konzentration der siRNA*-Cyclin-D1-Expression nach unterschiedlichen Cyclin-D1-siRNA-Konzentrationen in HCT116-Zellen.

Mit 200 nM Cyclin-D1-siRNA wurde die maximale Cyclin-D1-Suppression in HCT116-Zellen erzielt.

Um zu analysieren, ob die Suppression von Cyclin D1 in HCT116-Zellen durch siRNA nach DNA-Schädigung mit SN-38 Apoptose induzieren kann, habe ich nach der SN-38-Behandlung Cyclin D1 mittels siRNA in HCT116-Zellen supprimiert. Cyclin-D1-Expression und PARP-Spaltung wurden im Western Blot dargestellt.

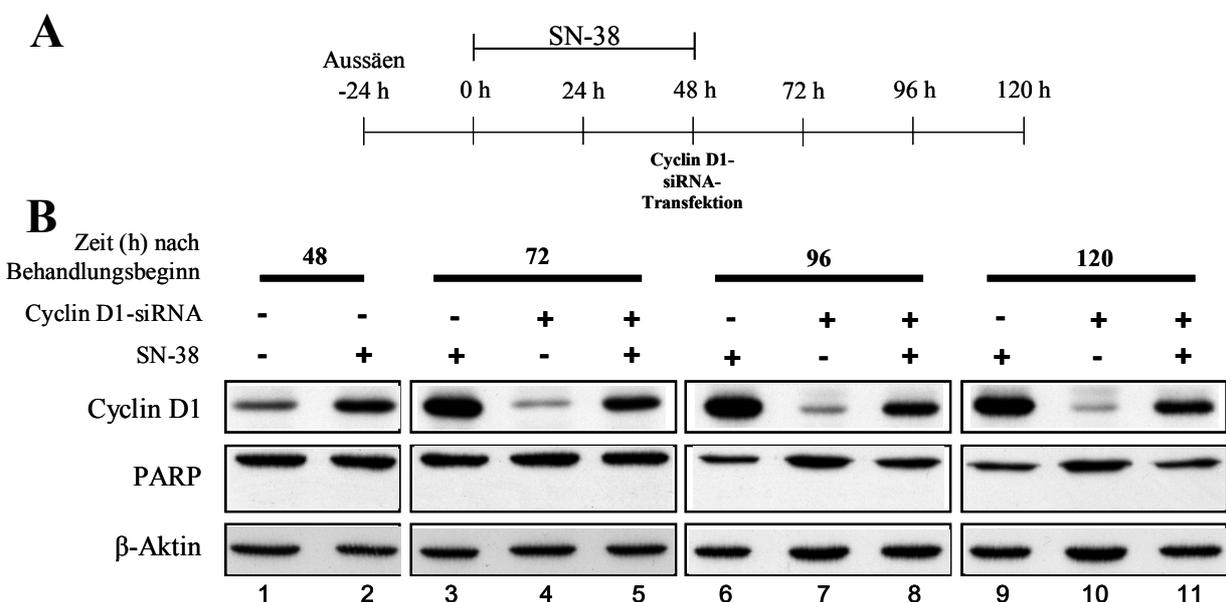


Fig. 37: *Einfluss der Cyclin-D1-Suppression und der SN-38-Behandlung in HCT116-Zellen*  
**A:** Zeitschema **B:** Cyclin-D1-Expression nach der Transfektion mit einem Cyclin-D1-siRNA (200 nM) und nach Behandlung mit SN-38 in HCT116-Zellen. Resultat ist repräsentativ für zwei Experimente.

Die SN-38-induzierte Apoptose wurde durch Suppression von Cyclin D1 nicht beeinflusst (Fig. 37, Bahn 4 vs. 5, 8 vs. 9 und 10 vs. 11). Somit konnte zwischen der schädigungsbedingten

Apoptose und der Cyclin-D1-Expression weder nach Überexpression noch nach Suppression von Cyclin D1 ein Zusammenhang hergestellt werden.