

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral und Gefäßchirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss von Darifenacin auf die tumorspezifische
Signaltransduktion in der Kolonkarzinomzelllinie HT29

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Rayoung Kim

aus Seoul

Datum der Promotion: 18.09.2020

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
Zusammenfassung	9
Summary	10
1. Einleitung	11
1.1. Kolonkarzinom	11
1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie des Kolonkarzinoms in Deutschland	11
1.1.2. Aktuelle Therapiemöglichkeiten und Prognose	11
1.1.3. Muskarinischer Rezeptor Typ 3 im Kolonkarzinom	14
1.2. Der muskarinische Acetylcholinrezeptor	15
1.2.1. Vorkommen und physiologische Bedeutung	15
1.2.2. Signaltransduktion über G-Proteine	16
1.2.3. Signaltransduktion über M3R	17
1.3. Darifenacin	20
1.3.1. Indikation	20
1.3.2. Darifenacin als ein experimenteller therapeutischer Ansatz in onkologischen Studien	20
1.4. Zielsetzung der Arbeit	22
2. Material und Methoden	23
2.1. Geräte und Materialien	23
2.1.1. Geräte	23
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	24
2.1.3. Laborchemikalien und Reagenzien	25
2.1.4. Antibiotika	26
2.1.5. Puffer und Lösungen	26
2.1.6. Gebrauchsfertige Kits und Lösungen	27
2.1.7. Antikörper	28
2.1.8. Zytokine	28
2.1.9. Software	29
2.2. Zellbiologische Methoden	30
2.2.1. Zellkultur	30
2.2.2. Inkubation der Zellen für Phosphorylierungsstudien	31

2.2.3. MTT-Assay	33
2.2.4. BrdU-Assay	34
2.2.5. Invasions-Assay	35
2.3. Biochemische Methoden	37
2.3.1. Proteinextraktion aus HT29 Zellen	37
2.3.2. Proteinbestimmung	37
2.3.3. Western Blot-Analysen	37
2.4. Statistische Auswertung	40
3. Ergebnisse	41
3.1. Einfluss von Darifenacin auf die Proliferation und Viabilität von HT29-Zellen ..	41
3.2. Einfluss von Darifenacin auf das Invasionsverhalten von HT29-Zellen	43
3.3. Veränderungen im Phosphorylierungsmuster von Signalmolekülen der M3R- Signalkaskade durch Darifenacin	45
3.3.1. Einfluss von Darifenacin auf die Phosphorylierung verschiedener Kinasen in Abhängigkeit der Inkubationsdauer	45
3.3.2. Einfluss von Darifenacin auf eine durch Acetylcholin induzierte Phosphorylierung verschiedener Kinasen	47
4. Diskussion	52
Eidesstattliche Versicherung	66
Curriculum Vitae	67
Danksagung	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: 5-Jahre-Überlebensrate bei Kolonkarzinompatienten nach UICC-Stadium ..	13
Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Kolonkarzinoms	14
Tabelle 3: Die Lokalisation der Muskarinische Rezeptortypen	15
Tabelle 4: Bisherige Forschungsergebnisse zur Signaltransduktion des muskarinischen Rezeptors Typ 3	19
Tabelle 5: Affinität von muskarinischen Antagonisten zu muskarinischen Rezeptoren (Durchschnitt der pKi-Werte, übernommen aus (53))	20
Tabelle 6: Funktionelle Profile von muskarinischen Antagonisten (Durchschnitt der pA2-Werte, übernommen aus (53)).....	21
Tabelle 7: Versuchsdesign für MTT-/BrdU-Assay	35
Tabelle 8: Transferzeit nach Proteinmasse	39

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der Signaltransduktionswege über M3R. Das Schema zeigt bekannte intrazelluläre Signalkaskaden des M3R in Kolonkarzinomzellen	18
Abbildung 2: Inkubationsschema für Phosphorylierungsstudien.....	31
Abbildung 3: Inkubationsschema für Phosphorylierungsstudien mit ACh-Stimulation ...	32
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Invasions-Assay	36
Abbildung 5: Aufbau beim Tankblot-Verfahren	39
Abbildung 6: Proliferationsrate der HT29-Zellen.....	41
Abbildung 7: Viabilität der HT29-Zellen	42
Abbildung 8: Einfluss von Darifenacin auf die Invasion der HT29-Zellen.....	44
Abbildung 9: Einfluss von Darifenacin auf die Phosphorylierung verschiedener Kinasen in Abhängigkeit der Inkubationsdauer.....	46
Abbildung 10: Einfluss von Darifenacin auf die durch ACh-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2	48
Abbildung 11: Einfluss von Darifenacin auf die durch ACh-induzierte Phosphorylierung von p38.....	49
Abbildung 12: Einfluss von Darifenacin auf die durch ACh-induzierte Phosphorylierung von Akt1.....	50
Abbildung 13: Einfluss von Darifenacin auf die Phosphorylierung von Src durch ACh und Darifenacin.	51

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
ca.	zirka
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
DAG	Diacylglycerol
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (engl. epidermal growth factor Receptor)
engl.	englisch
ERK	(engl. extracellular signal-regulated kinase)
et al.	et alii
etc.	et cetera
4-DAMP	1,1-dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidinium-Iodid
FKS	fetales Kälberserum
Gr	Gruppe
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase 3 (engl. Glycogen synthase kinase 3)
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IP3	Inositoltrisphosphat
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
lat.	lateinisch
M1R	muskarinischer Acetylcholinrezeptor Typ1
M2R	muskarinischer Acetylcholinrezeptor Typ2
M3R	muskarinischer Acetylcholinrezeptor Typ3

M4R	muskarinischer Acetylcholinrezeptor Typ4
M5R	muskarinischer Acetylcholinrezeptor Typ5
mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
MAPK	Mitogen-aktivierten Proteinkinase
Min	Minute
μM	Mikromol
ml	Milliliter
MMP1	Metalloproteinase-1
mTOR	mammalian target of rapamycin
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyl Tetrazoliumbromid
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
ng	Nanogramm
p90-RSK	p90-ribosomale s6-Kinase (engl. p90-ribosomal s6 kinase)
p-	phosphoryliert(e)
p-F-HHSiD	p-Fluoro-hexahydrosila-difenidol
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PKB	Proteinkinase B
%	Prozent
Rho-GEF	Rhodopsin-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor
s.	siehe
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl. Standard error of the mean)
SRB-Assay	Sulforhodamine-B Assay
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor α

UICC Union internationale contre le cancer

ZNS zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Der muskarinische Rezeptor Typ 3 (M3R) ist im Kolonkarzinom überexprimiert und spielt möglicherweise eine Rolle für seine Entstehung und Progression. Die Transaktivierung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) durch M3R spielt dabei eine wesentliche pathophysiologische Rolle. Die extrazelluläre signalregulierte Kinase 1/2 (ERK1/2), Akt1 sowie p90-ribosomale S6-Kinase (p90 RSK) führen zu gesteigerter Zellproliferation und vermindertem Zelluntergang. Neben dem M3R-EGFR-Signalweg führt die M3R-Aktivierung über die mitogen aktivierte Proteinkinase p38 zu einer gesteigerten Invasivität der Tumorzellen, was insbesondere für die Metastasierung des Kolonkarzinoms von Bedeutung ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des M3R-selektiven-Antagonisten Darifenacin auf die Zellproliferation, die Zellviabilität, das Invasionsverhalten und auf verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 untersucht. Dazu wurden Proliferations- und Viabilitätsassays, Invasionsstudien sowie Western Blot-Untersuchungen durchgeführt.

Darifenacin hemmte in einer Dosierung von 10 μM die Proliferation von HT29-Zellen. Die Zellviabilität von HT29-Zellen wurde ebenfalls durch 10 μM Darifenacin reduziert. Das invasive Verhalten von HT29-Zellen, welches durch Stimulation mit dem M3R-Liganden Acetylcholin (ACh) stimuliert wurde, konnte mit 1 μM Darifenacin inhibiert werden. Wurden die Zellen mit ACh stimuliert, inhibierte Darifenacin die Aktivierung von ERK1/2, Akt1 und p38. Die Signalwege von Src, JNK und mTOR wurden nicht von Darifenacin beeinflusst.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Zellinvasion, -migration und -proliferation der Kolonkarzinomzelllinie HT29 durch Darifenacin inhibiert werden können. Die gezielte Hemmung der M3R-Signaltransduktion könnte so einen effektiven pharmakologischen Angriffspunkt in der Therapie des Kolonkarzinoms darstellen.

Summary

In colon carcinoma, the overexpression of the muscarinic receptor type 3 (M3R) was observed and may play a role in its development and progression.

Recent research on the signaling cascade of M3R, which is involved in the regulation tumor development and growth, shows that the trans-activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) through M3R plays an important role for pathophysiology. By transactivation, the signal leads to cell proliferation and survival through extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), Akt1 and p90-ribosomal S6-Kinase (p90 RSK). Independently from M3R-EGFR, the activation of M3R could lead to cell invasion through the mitogen activated protein kinase p38, which plays a role for metastasis.

To study the influence of the M3R-selective antagonist darifenacin on cell proliferation, metabolic activity, invasion and intracellular signaling cascades in the colon carcinoma cell line HT29, proliferation assays, viability tests, invasion assays and Western-blot were performed.

In the present study, 10 μ M darifenacin was shown to reduce the proliferation of HT29 cells. The viability of HT29 cells was also strongly inhibited by 10 μ M darifenacin. The invasive behavior of HT29, notably induced by acetylcholine (ACh) stimulation, was significantly inhibited with 1 μ M darifenacin. Western Blot analysis showed that darifenacin inhibited the ACh-induced phosphorylation of ERK1/2, Akt1 and p38 in HT29 cells. The signaling pathways of Src, JNK and mTOR were not affected by darifenacin.

The results of this work show that darifenacin inhibits cell invasion, migration, and proliferation in HT29 cells, suggesting M3R as a promising target for the treatment of colon carcinoma.

1. Einleitung

1.1. Kolonkarzinom

1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie des Kolonkarzinoms in Deutschland

Das Kolonkarzinom ist eine der häufigsten Krebserkrankungen in den Industrieländern und hat in Deutschland eine große Bedeutung durch seine hohe Inzidenz und Mortalitätsrate. Nach einem Bericht des Robert-Koch-Instituts ist die Inzidenz des Kolonkarzinoms bei Männern die dritthöchste und bei Frauen die zweithöchste unter allen Krebserkrankungen. Trotz der seit 1999 stetig abnehmenden Mortalitätsrate des Kolonkarzinoms durch die Etablierung der Krebsvorsorge, Reduzierung der bekannten Risikofaktoren sowie modernen Therapieansätze bleibt die Inzidenz des Kolonkarzinoms bei Männern und Frauen unverändert hoch (1-3).

Das mittlere Erkrankungsalter für das Kolonkarzinom liegt bei Männern und Frauen bei 72 beziehungsweise 75 Jahren. Als Risikofaktoren sind neben genetischen Dispositionen das höhere Alter (> 50 Jahre), fettreiche und ballaststoffarme Ernährung, Adipositas, Rauchen, Alkohol sowie chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn bekannt (4).

1.1.2. Aktuelle Therapiemöglichkeiten und Prognose

Nach den aktuellen Leitlinien werden Patienten mit einem Kolonkarzinom, das entweder keine oder operable Lungen- oder Lebermetastasen aufweist, chirurgisch therapiert, solange keine Kontraindikationen für eine Operation vorliegen. Dabei wird eine en-bloc-Resektion des Primärtumors angestrebt. Zur Bestimmung des pN-Status sollen ≥ 12 regionäre Lymphknoten bei der Operation entfernt und pathologisch untersucht werden (5). Eine Ausnahme der obengenannten chirurgischen Therapie stellt ein endoskopisch R0-reseziertes pT1-Karzinom in der Low-risk-Situation (G1 oder G2, L0) mit einer Submukosainfiltration von $< 1.000 \mu\text{m}$ dar. Erfolgt keine komplette Abtragung eines Low-risk-pT1-Karzinoms, ist eine lokale chirurgische Resektion vorzunehmen (4).

Während bei den Patienten mit einem kurativ resezierten Kolonkarzinom im UICC-Stadium I keine adjuvante Therapie indiziert ist, kann bei den Patienten im UICC Stadium

II eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden. Bei den Patienten im UICC Stadium II mit Risikofaktoren wie T4-Tumor, Tumorperforation/-einriss, Operation unter Notfallbedingungen, zu geringe Anzahl untersuchter Lymphknoten sollte eine adjuvante Therapie erwogen werden. Bei den Patienten im UICC Stadium II wird vor einer adjuvanten Chemotherapie der Mikrosatellitenstatus bestimmt und bei nachgewiesener Mikrosatelliteninstabilität sollte keine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden. Für Patienten im UICC Stadium III im guten Allgemeinzustand wird eine adjuvante Chemotherapie mit Oxaliplatin in Kombination mit 5-FU/Folinsäure (FS) empfohlen (5).

Bei einem metastasierten Kolonkarzinom, für das primär keine chirurgische Interventionsmöglichkeit besteht, stellt die palliative systemische Chemotherapie die Therapie der Wahl dar. Dabei wird in der Regel eine Kombination aus zytotoxischen Substanzen mit einem gegen Antigene der Tumorzellen gerichteten Antikörper kombiniert in Abhängigkeit vom molekularpathologischen Profil des Tumors, d. h. Mutationsanalyse von RAS und BRAF (5).

Die Prognose des Kolonkarzinoms hängt vom-UICC Stadium ab. Dieses sowie die 5-Jahre-Überlebensrate sind in Tabelle 1 dargestellt (4). Dabei dient die TNM-Klassifikation zur Einteilung der Krebserkrankungen nach ihrer anatomischen Ausbreitung (6) und T, N und M von TNM-Klassifikation steht jeweils für eine lokale Ausbreitung des Primärtumors (T), eine Metastasierung in regionäre Lymphknoten (N) und eine Fernmetastasierung (M) (7). Je nach der Ausbreitung des Kolonkarzinoms werden T, M und N so aufgeteilt wie in Tabelle 2 dargestellt (8).

Tabelle 1: 5-Jahre-Überlebensrate bei Kolonkarzinompatienten nach UICC-Stadium

UICC-Stadium	TNM	5-Jahre-Überlebensrate
I	T1, T2, N0, M0	93%
IIa	T3, N0, M0	85%
IIb	T4a, N0, M0	72%
IIc	T4b, N0, M0	72%
IIIa	T1 N2a, T1/2 N1, M0	83%
IIIb	T1/2 N2b, T2/3 N2a, T3/4a N1, M0	64%
IIIc	T4b N1/2, T3/4b N2b, T4a N2a, M0	44%
IVa	jedes T jedes N M1a	8%
IVb	jedes T jedes N M1b	8%

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Kolonkarzinoms

T: Primärtumor	
T1	Infiltration der Submukosa
T2	Infiltration der Muscularis propria
T3	Infiltration der Subserosa, Infiltration des perikolischen, perirektalen Fettgewebes
T4a	Infiltration des viszeralen Peritoneums
T4b	Infiltration anderer Organe
N: Lymphknotenbefall	
N0	Kein Lymphknoten betroffen
N1	1-3 regionäre Lymphknoten
N2a	4-6 regionäre Lymphknoten
N2b	7≥ regionäre Lymphknoten
M: Fernmetastasen	
M1a	Fernmetastasen eines Organs
M1b	Fernmetastasen von mehr als ein Organ oder Peritonealkarzinose

1.1.3. Muskarinischer Rezeptor Typ 3 im Kolonkarzinom

Im frühen Stadium des Kolonkarzinoms kann eine adjuvante Chemotherapie nach erfolgter Tumorresektion einen guten Therapieerfolg erzielen, während in einem späteren Stadium eine deutlich niedrige 5-Jahres-Überlebensrate zu erwarten ist. Dabei findet sich oft eine Therapieresistenz gegen die üblichen Chemotherapien, welche Cisplatin, Irinotecan und 5-Fluorouracil beinhalten. Deshalb werden neue Therapieansätze für das Kolonkarzinom intensiv erforscht (9).

Im Fokus der vorliegenden Untersuchungen steht die Signalkaskade des muskarinischen Acetylcholinrezeptor Typ 3 (M3R). In jüngeren Studien wurde eine Überexpression des M3R im Kolonkarzinom berichtet (10). Weitere Studien beschreiben einen Einfluss des M3R auf Proliferation, -wachstum, -überleben, -migration und -invasion von Kolonkarzinomzellen (11-21). Darüber hinaus spielen die von M3R aktivierten Signalkaskaden über Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt1 und die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-p38 α möglicherweise eine Rolle gegen eine Chemotherapie-Resistenz (22, 9, 23).

1.2. Der muskarinische Acetylcholinrezeptor

1.2.1. Vorkommen und physiologische Bedeutung

Acetylcholin ist ein Neurotransmitter und spielt eine Rolle sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem. Acetylcholinrezeptoren lassen sich in nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR) und muskarinische Acetylcholinrezeptoren einteilen. Während die nAChR im Bereich der motorischen Endplatten und auf prä- sowie postganglionären Neuronen lokalisiert sind, befinden sich die mAChR in parasympathisch innervierten Organen sowie im zentralen Nervensystem (ZNS) (24-26). Auch hinsichtlich der Rezeptoraktivierung und Signaltransduktion unterscheiden sich die beiden Rezeptortypen voneinander. Im Vergleich zu den nAChR, die ligandengesteuerte Ionenkanäle sind, handelt es sich bei den mAChR um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Guanylnukleotid-tragendes Protein; GPCR).

Bisher sind fünf verschiedene muskarinische Rezeptortypen bekannt (M1R-M5R). Ihre Expression in verschiedenen Organen ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Die Lokalisation der Muskarinische Rezeptortypen

Subtyp	Vorkommen	Quelle
M1R	ZNS, Gastrointestinaltrakt, Lymphozyten	(27, 28)
M2R	Herz, Trachea, Harnblase, ZNS	(25)
M3R	Speicheldrüse, ZNS, Gastrointestinaltrakt, glatte Muskulatur	(27, 28)
M4R	ZNS, glatte Muskulatur	(25)
M5R	ZNS	(25)

Im Gastrointestinaltrakt spielen muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR) eine wichtige Rolle für die Regulation einer Vielzahl physiologischer Prozesse. Nicht nur die Motilität bzw. der Tonus des Darmtraktes, sondern auch die Sekretion von Speichel sowie Pepsinogen werden durch muskarinische Rezeptoren reguliert (29, 27, 28). Im gesunden Kolonepithel überwiegt die Expression des muskarinischen Rezeptor Typ 1 (M1R) mit einem 80-prozentigen Anteil unter allen Muskarinrezeptortypen. Der M3R ist hingegen wesentlich weniger exprimiert, etwa 20 % (30, 31). In einem pathologisch veränderten

Kolon, wie etwa im Rahmen einer Kolitis oder einem Kolonkarzinom, wurde eine reduzierte M1R-Expression und eine erhöhte Expression von M3R beobachtet (31).

1.2.2. Signaltransduktion über G-Proteine

Wie eingangs erwähnt, sind die muskarinischen Rezeptoren an G-Proteine gekoppelt. GPCR entfalten ihre Funktion über drei Komponenten: G-Proteine, GPCR Kinase (GRK) und β -Arrestine (32). G-Proteine sind heterogene Proteinkomplexe aus 3 Komponenten: der G_α -, G_β - und G_γ -Untereinheit (33). Durch Bindung eines Agonisten an diesen transmembranären Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung des intrazellulären G-Proteins (34). Die Dissoziierung der G-Proteine aktiviert nachgeschaltete intrazelluläre Effektorproteine (20). Bis jetzt wurden 21 Subtypen von G_α -Untereinheiten entdeckt und nach der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz in vier Gruppen eingeteilt: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i/\alpha o}$, $G_{\alpha q/\alpha 11}$ und $G_{\alpha 12/\alpha 13}$ (34). Die jeweiligen G-Proteinfamilien schalten eigene intrazelluläre Signalkaskaden an. Die $G_{\alpha s}$ -Proteinfamilie aktiviert die Adenylatzyklase. Dies erhöht die Konzentration des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) in den Zellen und anschließend die Aktivität von Proteinkinase-A (PKA). Im Gegensatz dazu inhibiert die $G_{\alpha i}$ -Proteinfamilie die Adenylatzyklase und bringt eine inhibierende Reaktion mit sich. Die $G_{\alpha q}$ -Proteinfamilie aktiviert die Phospholipase C (PLC). Die $G_{\alpha 12/\alpha 13}$ -Proteinfamilie aktiviert die Rhodopsin-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (Rho-GEF), welche dann Rho aktivieren (35). Die G_β - und G_γ -Untereinheit stellen als $G_{\beta\gamma}$ -Dimer eine funktionelle Einheit dar und spielen sowohl eine wichtige regulatorische Rolle als auch eine von G_α -unabhängige Rolle in Signalkaskaden. Durch die unterschiedlichen Zusammensetzungen der G_α , G_β , G_γ Einheiten und der $G_{\beta\gamma}$ Einheiten ist eine differenzierte Signaltransduktion der G-Proteinkomplexe möglich (36, 33).

1.2.3. Signaltransduktion über M3R

Im Kolonepithel werden hauptsächlich M3R und M1R exprimiert (31). In dieser Arbeit wird der M3R, der in Kolonkarzinomzellen überexprimiert wird, untersucht. Es ist nachgewiesen, dass M3R bevorzugt mit den $G_{\alpha q} / G_{11}$ -Proteinen koppelt (25). Jedoch wurde auch beschrieben, dass der M3R mit verschiedenen G-Proteinkomplexen koppelt (37, 38). Beispielsweise wird in der humanen Kolonzelllinie HCT-15 das Signal über die Kopplung mit $G_{\alpha q}$ - und $G_{\alpha s}$ -Protein weitergeleitet. In der in dieser Studie verwendeten HT29-Zelllinie wird das Signal von M3R durch verschiedene Wege inklusive $G_{\alpha q}$ -, $G_{\alpha i}$ -Protein sowie ROCK weitergeleitet (37, 39). Die bisher bekannten, über M3R-aktivierten intrazellulären Signalmoleküle oder -kaskaden sowie deren Funktionen in verschiedenen Zelllinien werden in Abbildung 1 und in Tabelle 4 zusammengefasst.

Das Modell in Abbildung 1 zeigt die Signaltransduktionswege über M3R. Nachdem der M3R durch einen Agonisten gebunden wird, kommt es zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC). PLC hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP3). IP3 erhöht die intrazelluläre Calciumkonzentration und DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC) (40). Diese Signalüberleitung über M3R führt zur Transaktivierung des EGFR, die eine Aktivierung der MAPK ERK1/2 bedingt. Dabei wird eine Expression von Metalloproteinase-1 (MMP1) induziert, die für die Invasivität und Migration von Tumorzellen eine wichtige Rolle spielt (19). Außerdem führt die Transaktivierung des EGFR zur Aktivierung von Akt1 und p90, was für die Proliferation und das Überleben der Zellen eine wichtige Rolle spielt (41, 16, 42). Neben dieser Signaltransduktion über EGFR stimuliert eine Aktivierung des M3R durch ACh direkt die Phosphorylierung der MAPK p38. Die Aktivierung von p38 führt ebenfalls zu einer verstärkten Expression der MMP1 (12, 14, 16, 43).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kolonkarzinomzelllinie HT29 verwendet, die sowohl M3R als auch EGFR exprimieren (44). Die Expression des M3R überwiegt in HT29, allerdings werden auch M1R, M2R und M4R exprimiert (39). Von bisherigen Studien an HT29 ist die Transaktivierung von EGFR über M3R sowie die Zellregulierung durch Signalkaskaden wie ERK1/2, Akt-1 und p38 bekannt (45, 19, 46, 47).

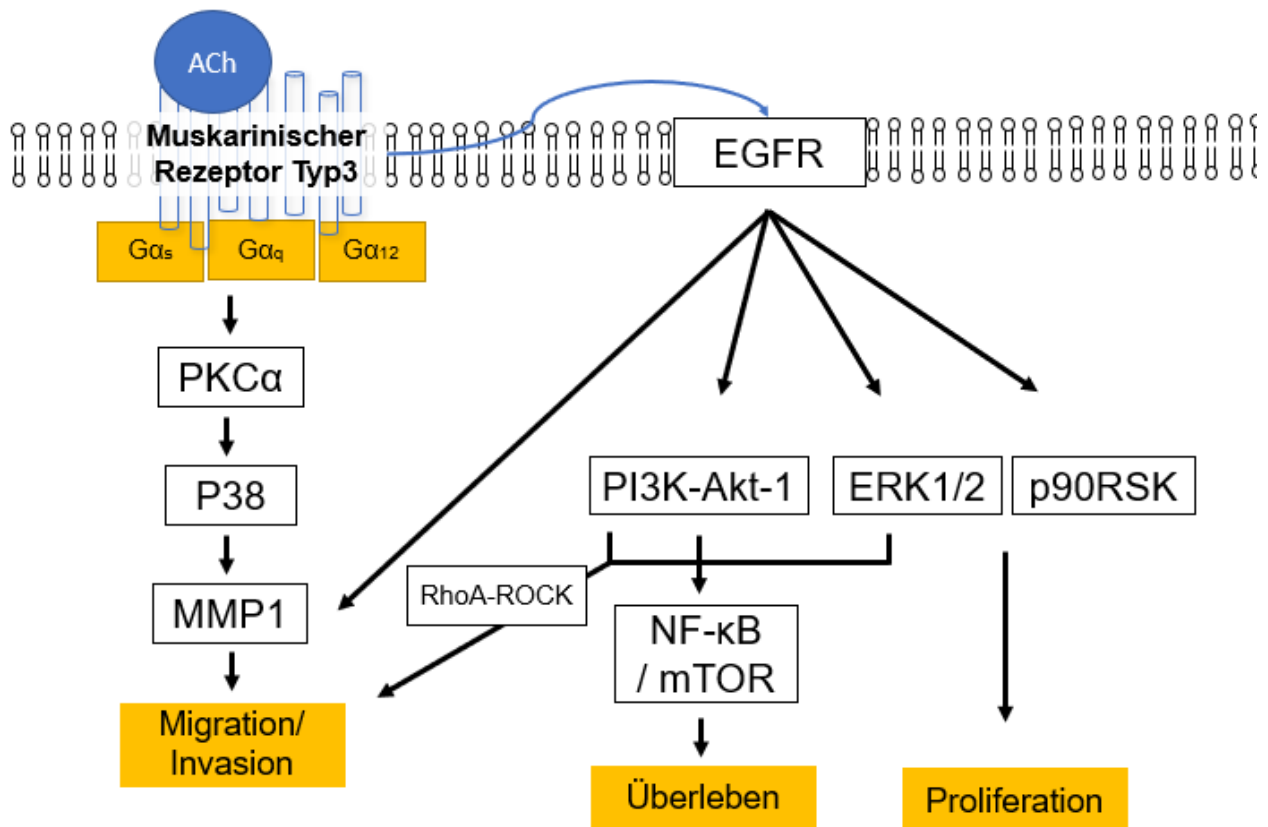


Abbildung 1: Schema der Signaltransduktionswege über M3R. Das Schema zeigt bekannte intrazelluläre Signalkaskaden des M3R in Kolonkarzinomzellen. Signalüberleitung über M3R führt zur Transaktivierung des EGFR, die eine Aktivierung der MAPK ERK1/2, Akt1 und p90 bedingt, was für Zellinvasion, -proliferation und -überleben relevant ist. Neben der Transaktivierung des EGFR stimuliert eine M3R-Aktivierung direkt die der Phosphorylierung von p38, was zur Expressionssteigerung der MMP1 führt. (Modifiziert übernommen aus (16, 42, 19))

Tabelle 4: Bisherige Forschungsergebnisse zur Signaltransduktion des muskarinischen Rezeptors Typ 3

Zelllinie oder Gewebe	Bestätigte Signalkaskade	Quelle
HT29 (Kolonkarzinomzelllinie)	[Ca ²⁺] _i ↑ → ERK1/2	(47)
HT29 (Kolonkarzinomzelllinie)	ERK1/2, p38, EGFR	(19)
HT29, H508 (Kolonkarzinomzelllinie)	Akt-NFκB, EGFR	(46)
H508 (Kolonkarzinomzelllinie)	ERK1/2, p90 ribosomal-S6-Kinase (RSK)	(12)
SNU – 407 (Kolonkarzinomzelllinie)	MEK-ERK1/2, PI3K-Akt-mTORC1-S6K1, p90-RSK	(16-18)
SK-N-SH (Neuroblastom)	ERK1/2	(24)
H82, H1649 (SCLC- Zelllinien)	ERK1/2, Akt	(48, 49)
MKN45/BGC823 (Magenkarzinomzelllinien)	EGRF-ERK1/2, Akt	(43)
MKN45/MGC803 (Magenkarzinomzelllinien)	AMP-activated protein kinase (AMPK)- Metastasis-associated in colon cancer-1 (MACC1)	(50)
Prostatakarzinom	Calmodulin/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaM/CaMKK)-Akt	(51)

1.3. Darifenacin

1.3.1. Indikation

Darifenacin ist ein M3R-selektiver Muskarinrezeptor-Antagonist und derzeit zur Behandlung der Dranginkontinenz in Deutschland zugelassen (52). Trotz höherer Selektivität von Darifenacin für M3R im Vergleich zu anderen muskarinischen Rezeptor-Antagonisten ist die Bindung von Darifenacin an M1R und M2R bekannt (53) (s. Tabelle 5). Als eine durch M1R vermittelte Reaktion von Darifenacin ist die Inhibierung der Magensäureproduktion und als eine durch M2R vermittelte Reaktion von Darifenacin ist eine erhöhte Herzfrequenz bekannt. Als sehr häufige Nebenwirkungen von Darifenacin treten Mundtrockenheit und Obstipation auf, während Kopfschmerzen, Bauchschmerzen, Übelkeit, Dyspepsie und trockene Augen als häufige Nebenwirkungen beschrieben sind (54). Im Vergleich zu anderen M3R-Antagonisten besteht jedoch kein Hinweis auf kognitive Dysfunktionen oder kardiovaskuläre Nebenwirkung (55-57).

Tabelle 5: Affinität von muskarinischen Antagonisten zu muskarinischen Rezeptoren (Durchschnitt der pKi-Werte, übernommen aus (53))

	M1R	M2R	M3R	M4R	M5R
Darifenacin	8,15	7,35	9,12	7,34	8,03
Atropin	9,55	8,88	9,56	8,94	9,18
Dicyclomin	8,70	6,89	8,32	7,54	7,78
Tolterodin	8,75	7,98	8,53	7,67	7,74
Oxybutynin	8,69	7,77	8,86	8,02	7,43

1.3.2. Darifenacin als ein experimenteller therapeutischer Ansatz in onkologischen Studien

Mehrere Studien deuten auf die Rolle von Acetylcholin als ein potenzieller Wachstumsfaktor hin, indem es die Proliferation und Metastasierung des Karzinoms über die Aktivierung von M3-Rezeptoren stimuliert (21, 50, 43). Daher wurde der M3R-selektive Antagonist Darifenacin bereits hinsichtlich seines antiproliferativen Potentials in mehreren onkologischen Studien untersucht. Im Prostatakarzinom wurde das Tumorwachstum sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* durch Darifenacin gehemmt (51). Außerdem hemmt Darifenacin das Wachstum der Magenkarzinomzelllinien MKN45 und BGC823 und inhibiert die Invasion sowie Migration der Magenkarzinomzelllinien MKN45

und MGC803 (50, 43). Außerdem wurde von einem hemmenden Effekt von Darifenacin auf das Wachstum von zwei Lungenkarzinomzelllinien berichtet (58, 49). Eine Studie zeigte, dass Darifenacin je nach Organ mit unterschiedlicher Potenz wirkt (s. Tabelle 6). Dabei wurde das Maß der an den Organen wirkenden Potenz durch den pA_2 -Wert berechnet. Der pA_2 -Wert ist der negative dekadische Logarithmus der Antagonisten-Konzentration, bei der die Agonisten-Konzentration verdoppelt werden muss, um die gleiche Wirkung wie bei Abwesenheit eines Antagonisten zu beobachten (59). Tabelle 6 zeigt, dass Darifenacin im Ileum mit der größten Potenz wirkt, besser als an der Blase, Trachea, am Herzvorhof oder Samenleiter. In Vergleich dazu haben die anderen Antagonisten entweder keine besondere Potenz im Ileum oder wirken nicht spezifisch nur an Ileum, sondern auch an anderen Organen mit einer hohen Potenz (53).

Wenn der M3R-selektive Antagonist Darifenacin auch das Wachstum des Kolonkarzinoms bzw. dessen Metastasierung hemmen kann, könnte dies ein neuer Therapieansatz zur Mortalitätsreduktion in späten Stadien des Kolonkarzinoms sein.

Tabelle 6: Funktionelle Profile von muskarinischen Antagonisten (Durchschnitt der pA_2 -Werte, übernommen aus (53))

	Ileum vom Meerschweinchen	Urinblase vom Meerschweinchen	Trachea vom Meerschweinchen	Herzvorhof vom Meerschweinchen	Samenleiter vom Hasen
Darifenacin	9,44	8,66	8,70	7,48	7,90
Atropin	9,40	9,01	9,20	8,72	9,54
Dicyclomin	7,75	-	-	6,09	7,70
Tolterodin	-	7,77	-	7,68	8,49
Oxybutynin	-	7,44	-	7,12	7,90

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss des M3R-Antagonisten Darifenacin auf biologische Komponenten der Tumorprogression und auf die tumorspezifische Signaltransduktion in Kolonkarzinomzellen zu untersuchen. Dabei werden unter anderem Zellproliferation, metabolische Aktivität der Zellen sowie Zellinvasion nach Gabe von Darifenacin untersucht. Auf molekularer Ebene wird der Einfluss von Darifenacin auf verschiedene tumorspezifische Signalwege analysiert.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte und Materialien

2.1.1. Geräte

Geräte	Herkunft
Biofuge Primo R	Heraeus, Hanau
Microcentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1. 0	Heraeus, Hanau
Magnetstäbchen	Carl Roth, Karlsruhe
MR 3001	Heidolph, Schwabach
Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
IKA-Combimag RCT	Ika®-Werke, Staufen
Stuart SB 161 Stirrer	Cole-Parmer, Wertheim
Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Wippschüttler PMR-30	VWR, Darmstadt
3D gyraory rockers SSL3	Cole-Parmer, Wertheim
Eclipse TS100	Nikon, Düsseldorf
Practum 1102-1S Sartorius	BeWA-tec, Gelsenkirchen
Analysenwaagen	VWR, Darmstadt
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetus®	Hirschman, Eberstadt
Pipetboy acu 2	Integra, Biebertal
Vortex-Genie 2	Carl Roth, Karlsruhe
REAX top Reagenzglassschüttler	Heidolph, Schwabach
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad, München
PowerPAC 1000	Bio-Rad, München
Merck Millipore	Merck, Darmstadt
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad, München
Mini Trans-Blot Module	Bio-Rad, München
PH-Meter CG 840	Schott, Mainz
EL808 Ultra Microplate Reader	Bio-Tek, Bad Friedrichshall
Heraeus Kendro Hybridization oven Typ HERAhybrid 6	Heraeus, Hanau

Heraeus® Herafreeze® –80 °C HFC 586 Basic	Heraeus, Hanau
Fusion-FX7	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Varioklav Tisch-Horizontal	HP-Medizintechnik, Oberschleißheim
CO ₂ Incubator BB15	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Axiocam MRc5	Carl Zeiss, Oberkochen
MSC-Advantage™ biologische Sicherheitswerkbänke der Klasse II	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Sicherheitswerkbänke Heraeus® HERAsafe HSPC	Heraeus, Hanau

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Herkunft
Corning® BioCoat™ Matrigel® Invasion Chambers	Corning, Wiesbaden
Deckgläser	Langenbrinck, Emmendingen
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Corning, Wiesbaden
6-Wellplatte	Greiner Bio-One, Kremsmünster
24-Wellplatte	Corning, Wiesbaden
96-Wellplatte für MTT / BrdU Assay	Corning, Wiesbaden
Transfer-Membran PVDF	PerkinElmer, Rodgau
Whatman-Filterpapier	Merck, Darmstadt
Transparency Film A4	Ahrend, Köln
Sterilfilter Filtropur S 0.45	Sarstedt, Nürnbrecht
Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Corning, Wiesbaden

2.1.3. Laborchemikalien und Reagenzien

Laborchemikalien und Reagenzien	Herkunft
Acetylcholine Chloride	Merck, Darmstadt
Acetylcholine Chloride	Merck, Darmstadt
40% Acrylamid - Bisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Albumin Fraktion V, Proteasefrei (>98%)	Carl Roth, Karlsruhe
Aquatex	Merck, Darmstadt
Crystal Violet	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Bremen
DPBS (1x)	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Ethanol (≥99.5%)	Carl Roth, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom, Berlin
Glycin (99.5%)	Th. Geyer, Renningen
Methanol (≥99.9%)	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS) pellets	Carl Roth, Karlsruhe
Pageruler™Plus	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Proteinstandard (BSA)	Merck, Darmstadt
Salzsäure 37%	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumazid 99,5%	Merck, Darmstadt
Supersignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Stable Peroxide Solution, Stable Enhancer Solution)	Thermo Fisher Scientific, Bremen
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-etramethylethylendiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Tris (Hydoxymethyl) aminomethane	Merck, Darmstadt
0,5 M Tris-HCl buffer, pH 6,8	Bio-Rad, München
1,5 M Tris-HCl buffer, pH 8,8	Bio-Rad, München
Trypsin - EDTA	Biochrom, Berlin
Tween 20	Promega, Mannheim

2.1.4. Antibiotika

Antibiotika	Herkunft
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, Österreich

2.1.5. Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Materialien
APS-Lösung	10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS) ad 1 ml Aqua
BSA-Blockierungslösung (5%)	2 g BSA (Albumin Fraktion V, Proteasefrei) 8 mg Natriumazid ad 40 ml TBS/Tween
BSA-Standardlösung (50 µg/µl)	30 µl BSA – Stock (1 mg / 1ml) 3 µl Lyse – Puffer ad 600 µl Aqua bidest.
Elektrophoresepuffer	70 ml 10 x Puffer West 0,1 % SDS ad 700 ml Aqua bidest.
5x Laemmli Puffer (für 20 ml)	125 mM 0,5 M Tris pH 6,8 50 % Glycerol 500 mM DTT (Dithiothreitol) 10 % SDS 20 mg Bromphenolblau ad 20 ml Aqua bidest.
Lyse-Puffer	1 ml RIPA-Puffer 10 µl Protease - Inhibitor
MTT-Lösung	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid (M-2128 Sigma) 50 mg / 10 ml PBS
RIPA-Puffer	120 mM NaCl 25 mM Hepes pH 7,6 2 mM EDTA 25 mM NaF 1 % Triton X-100
Sammelgel	3,1 ml Aqua demin. 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl Puffer pH 6,8 0,5 ml Acrylamid-Bis (40 %) 50 µl 10 % SDS 50 µl 10 % APS 5 µl TEMED
TBS/Tween (pH 7.6)	30.5 g Tris 44 g NaCl 5 ml Tween 20 ad 5 l Aqua bidest.

Transferpuffer	100 ml 10 × Puffer West 100 ml Methanol ad 1 l Aqua bidest.
Trenngel (7,5 %)	5,4 ml Aqua demin. 2,4 ml 1,5 M Tris-HCl Puffer pH 8,8 1,88 ml Acrylamid-Bis (40 %) 100 µl 10 % SDS 200 µl 10 % APS 10 µl TEMED
Trenngel (10 %)	4,8 ml Aqua demin. 2,4 ml 1,5 M Tris-HCl Puffer pH 8,8 2,5 ml Acrylamid-Bis (40 %) 100 µl 10 % SDS 200 µl 10 % APS 10 µl TEMED
10 × Puffer West	144 g Glycin 30,4 g Tris (Trizma Base) ad 1 l Aqua bidest.

2.1.6. Gebrauchsfertige Kits und Lösungen

Kits und Lösungen	Herkunft
QuantiPro BCA Protein Assay Kit	Merck, Darmstadt
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche, Basel
Corning® BioCoat™ Matrigel® Invasion Chambers	Corning, Wiesbaden

2.1.7. Antikörper

Antikörper	Spezies	Herkunft
p44/42 MAPK (ERK 1/2)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
phospho-p44/42 MAPK (ERK 1/2)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
Akt	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
Phospho-Akt1 (Ser 473)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
p38	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
Phospho-p38	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
JNK	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
phospho-JNK	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
mTOR	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
phospho-mTOR	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
Anti-Mouse igG-Peroxidase	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Hamburg
Anti-Rabbit igG-Peroxidase	Ziege	Dianova, Hamburg
β -Actin	Ziege	Dianova, Hamburg

2.1.8. Zytokine

Zytokin	Herkunft
Interleukin-6	Thermo Fisher Scientific, Bremen

2.1.9. Software

Software	Herkunft
AxioVision 3.1.2.1	Carl Zeiss, Jena
ImageJ2	Laboratory for Optical and Computational Instrumentation (LOCI), University of Wisconsin-Madison
Lambda KC4 Kineticalc für Windows Version 2.7	MWG Biotech, Ebersberg
Vision-Capt Software	Vilber Lourmat, Eberhardzell

2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.1. Zellkultur

In dieser Arbeit wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie HT29 verwendet. Die adhärenzte Zelllinie wurde in Dulbecco-Modifiziertes-Eagle-Medium (DMEM) unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und Antibiotika (100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin) in 75 cm² Zellkulturflaschen unter physiologischen Bedingungen im Begasungsbrutschrank bei 37 °C in einer Atmosphäre von 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Einmal pro Woche wurden die Zellen gesplittet und neu ausgesät. Dafür wurden die Zellen einmal mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 3 ml 0,05 % Trypsin-EDTA bei 37 °C enzymatisch abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 7 ml DMEM aufgenommen und vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcontube überführt und bei 1.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml DMEM resuspendiert. Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe einer Neubauerzählkammer unter einem Lichtmikroskop. Anschließend wurden die Zellen Analysen-spezifisch ausgesät. Für Western Blot-Untersuchungen wurden 1,5 x 10⁶ Zellen pro 6-Well in 2 ml DMEM (mit 10 % FKS) ausgesät. Nach einem Tag wurden die inkubierten Zellen serumfreigesetzt und anschließend nach dem in Abschnitt 2.2.2 beschriebenen Experimentschema mit Substanzen inkubiert.

2.2.2. Inkubation der Zellen für Phosphorylierungsstudien

Um die zeitabhängige Wirkung von Darifenacin auf die Phosphorylierung verschiedener Signalmoleküle zu untersuchen, wurden die Zellen für 120 min, 60 min, 30 min, 20 min und 10 min jeweils mit 10 μ M Darifenacin inkubiert (Abbildung 2). In die Kontroll-Wellen wurde 0,1 % DMSO gegeben.

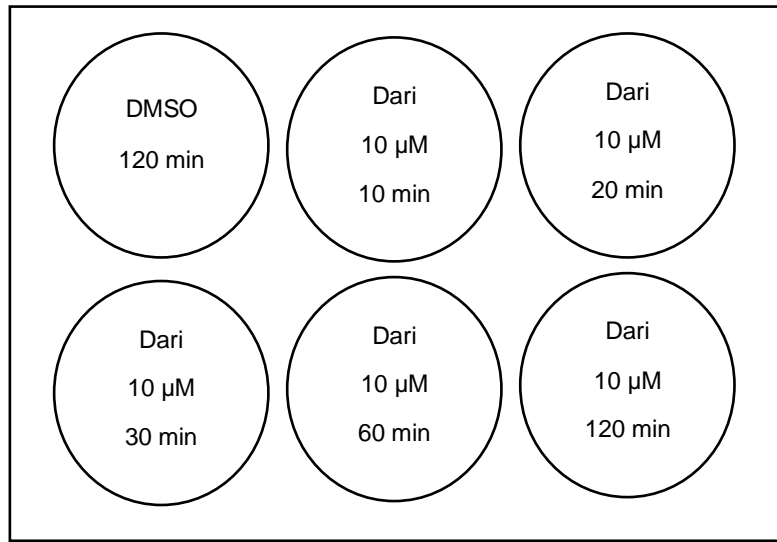


Abbildung 2: Inkubationsschema für Phosphorylierungsstudien Die Abbildung stellt das Inkubationsschema des Experiments zur Untersuchung des Einfluss' von Darifenacin auf die intrazellulären Signalkaskaden je nach Inkubationsdauer dar.

Für die Untersuchung der Darifenacinwirkung auf ACh-induzierte Signalwege wurden die Zellen ohne oder mit 0,1 μM , 1 μM und 10 μM Darifenacin für 1 Stunde inkubiert und anschließend für 5 min. 10 μM ACh in allen Wells, außer der Kontrolle, zugesetzt (Abbildung 3).

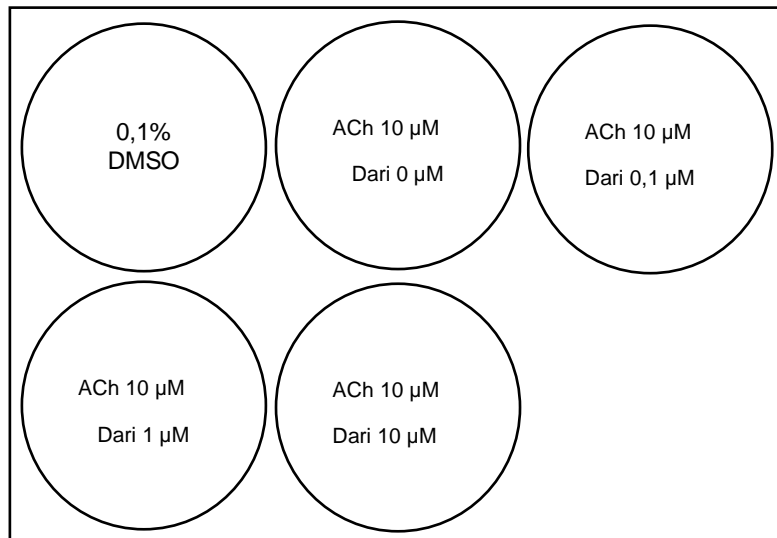


Abbildung 3: Inkubationsschema für Phosphorylierungsstudien mit ACh-Stimulation.

Zum Schluss wurde der Einfluss von Darifenacin in verschiedenen Konzentrationen bei mit 10 μM ACh stimulierten HT29-Zellen untersucht. Dabei wurden die serumfreigesetzten Zellen erst mit Darifenacin in den Konzentrationen 0,1 μM , 1 μM und 10 μM für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden 10 μM ACh für 5 Minuten hinzugefügt. Unter diesem Inkubationsschema wurde die Phosphorylierung von ERK1/2, Akt1, p38 und Src untersucht. Die 10 μM Dosis von ACh zeigte in Vorversuchen mit HT29-Zellen Effekte, daher wurde diese Dosis auch bei den Versuchen für die vorliegende Arbeit angewendet. Die ACh-Dosis der Vorversuche orientierte sich an einer Studie, die Effekte in der Kolonkarzinomzelllinie H508 mit 10 μM ACh als geringste mögliche Dosis festgestellt hatte (19).

2.2.3. MTT-Assay

Der MTT-Assay ist ein kolorimetrisches Verfahren und dient der Quantifizierung der metabolischen Aktivität von Zellen. Diesem liegt die Reduktion des gelben und wasserlöslichen Farbstoffs 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid (MTT) zu violettfarbenem Formazan zu Grunde. Abhängig von den mitochondrialen Dehydrogenasen wird dieser Reduktionsvorgang ermöglicht und als Reduktionsäquivalent wirken NADH sowie NADPH in Mitochondrien beziehungsweise in der Atmungskette. Letztendlich wird die metabolische Aktivität der Zellen quantitativ gemessen (60). In der vorliegenden Arbeit wurde die Änderung der metabolischen Aktivität der Zellen unter Einfluss von Darifenacin und Acetylcholin, wie in Tabelle 6 gezeigt, bestimmt. Hierbei wurde stets eine 6-fach-Bestimmung durchgeführt.

Zu Beginn des Assays wurden 5000 HT29-Zellen in 300 µl DMEM (mit 10% FKS) pro Well in einer 96-Well Kulturplatte ausgesät. Nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5,0 % CO₂ wurde das Medium vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurden jeweils 200 µl serumfreies DMEM pro Well ohne Substanzzugabe oder mit Darifenacin zu den Zellen hinzugegeben. Die Zugabe von Acetylcholin erfolgte eine Stunde nach der Darifenacingabe. Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden bei 37 °C und 5,0 % CO₂ inkubiert. Nach dem Inkubationsvorgang wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und anschließend 10%ige MTT-Lösung in 100 µl serumfreiem DMEM pro Well dazugegeben. Nach einer weiteren vierstündigen Inkubation bei 37 °C und 5,0 % CO₂ wurden die Zellen durch Zugabe von 100 µl 10%igem SDS lysiert. Nach drei weiteren Stunden wurde die Absorption bei 550 nm mit dem Spektrophotometer EL808 Ultra Microplate Reader (Bio-Tek, Vermont) gemessen.

2.2.4. BrdU-Assay

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Cell Proliferation ELISA, BrdU Kit (Roche, Mannheim) zur Bestimmung der Zellproliferation angewendet. 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) besteht aus Desoxyribose und 5-Bromuracil und ist ein chemisches Analogon von Thymidin (61). In proliferierenden Zellen wird BrdU bei der DNA-Replikation in die Nukleinsäuresequenz eingebaut und dies durch die sekundäre Antikörper-Bindung an BrdU detektiert. Der Einbau entspricht der Proliferationsrate der Zellen (62).

HT29-Zellen wurden entsprechend dem MTT-Assay ausgesät (s. Tabelle. 7) und bei 37 °C, 5 % CO₂ über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und anschließend 100 µl BrdU-Lösung, die in serumfreiem DMEM 1:1000 verdünnt wurde, zugegeben. Danach erfolgte eine dreistündige Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂, damit BrdU während der DNA-Replikation in die DNA eingebaut werden kann. Zur Fixierung der Zellen und Denaturierung der DNA wurde das Medium dekantiert und dann 200 µl FixDenat-Lösung in die Wells gegeben. Die folgende Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 30 Min. Anschließend wurde die Lösung vorsichtig abgekippt und 100 µl anti-BrdU-Peroxidase (POD)-Working-Solution (1:100 Anti-BrdU-POD-Stock-Solution in Anti-BrdU-POD-Working-Solution versetzt) pro Well hinzugegeben. Nach weiteren 90 Minuten bei Raumtemperatur wurde dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Substrate-Solution pro Well hinzugefügt. Die an BrdU gebundenen und POD-gelabelten Antikörper wurden nach der Zugabe von Substrate-Solution sichtbar gemacht. Die Peroxidase katalysiert die Konversion von Tetramethylbenzidine, was durch einen blauen Farbumschlag sichtbar wird. Unter Lichtschutz wurde für 15 Min inkubiert und zum Schluss wurden 25 µl 1 M H₂SO₄ pro Well hinzugegeben, um die Reaktion zu beenden. Dabei wird die blaufarbige Lösung in gelbliche Farbe geändert. Mit Hilfe des Spektrophotometer EL808 Ultra Microplate Reader (Bio-Tek, Vermont) erfolgte die photometrische Extinktionsmessung bei 450 nm.

Tabelle 7: Versuchsdesign für MTT-/BrdU-Assay

Gr.	Zellzahl	Substanzgabe	
1	ohne Zellen	-	-
2	5.000 Zellen / Well	-	-
3	5.000 Zellen / Well	-	10µM Acetylcholin
4	5.000 Zellen / Well	1µM Darifenacin	-
5	5.000 Zellen / Well	10µM Darifenacin	-
6	5.000 Zellen / Well	1µM Darifenacin	10µM Acetylcholin
7	5.000 Zellen / Well	10µM Darifenacin	10µM Acetylcholin

2.2.5. Invasions-Assay

Der Einfluss von Darifenacin auf die invasive Eigenschaft der HT29-Zellen wurde mithilfe des Kits Corning® BioCoat™ Matrigel® Invasion Chambers untersucht. Hierbei können die Zellen von einem Kompartiment zum anderen wandern; dabei stellt Matrigel eine Trennwand zwischen diesen Kompartimenten dar. Die Zellen wurden in serumfreiem Medium auf Filterinserts ausgesät, die wiederum in Wells mit serumhaltigem Medium platziert wurden. Die Durchführung der Experimente orientierte sich an der Anleitung des Kits.

Zur Rehydrierung des Matrigels wurden 500 µl serumfreies Medium in die Wells einer 24-Well Kulturplatte gegeben. Anschließend wurden die Inserts in die Wells gesetzt und ebenfalls mit 500 µl serumfreiem Medium gefüllt und diese Platte für 2 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ äquilibriert. Anschließend wurde das verwendete Medium vorsichtig abgesaugt und in die Inserts wurden 3 x 10⁵ HT29 Zellen in 500 µl serumfreien Medium ausgesät. In die Wells wurden 750 µl Medium mit 10 %igem FBS gegeben. Das FBS diente hierbei als Chemoattraktant. Die Zellen sowie das serumhaltige Medium wurden außerdem mit Darifenacin in Konzentrationen von 1 µM und 10 µM versetzt. Als Kontrolle galt das jeweilige Lösungsmittel, in diesem Fall 0,1 % DMSO. Nach einer Stunde

Kultivierung wurde 100 μM ACh hinzugefügt. Anschließend wurde eine Inkubation bei 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 für 48 Stunde durchgeführt. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium von den Filterinserts abgesaugt und die Zellen mit 500 μl 100 %igem Methanol für 20 Minuten fixiert. Zur Färbung wurde 0,2 % Crystal-Violett in 20 %igem Ethanol angesetzt. Nach einer zehnmütigen Färbung wurden die Inserts zweimal mit ddH_2O gewaschen. Nicht-invasive Zellen wurden mit Hilfe eines Wattestäbchens abgetragen. Anschließend wurde die Membran vorsichtig mit einem Skalpell aus dem Insert herausgelöst und mit Aquatex auf einem Objektträger eingedeckt. Nach dem Trocknen, über Nacht, konnten die in das Matrigel eingewanderten gefärbten Zellen unter dem Lichtmikroskop visualisiert werden.

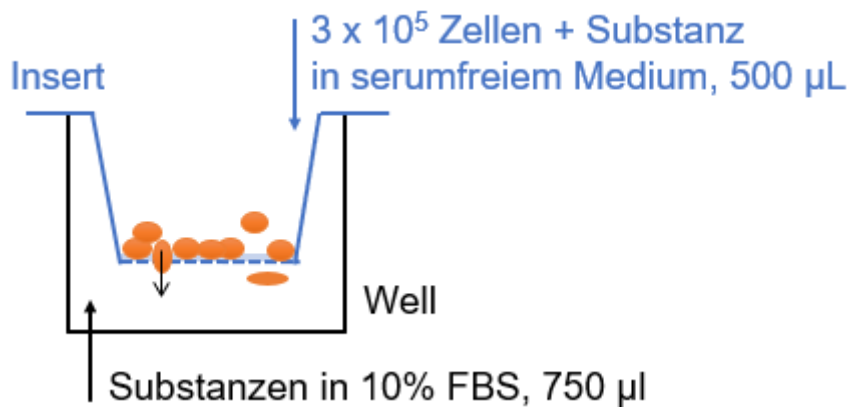


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Invasions-Assay In die Wells wurde 750 μl Medium mit 10 %igem FBS gegeben, das FBS diente hierbei als Chemoattraktant. In die Inserts wurden 3 x 10⁵ HT29 Zellen in 500 μl serumfreien Medium ausgesät.

2.3. Biochemische Methoden

2.3.1. Proteinextraktion aus HT29 Zellen

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeiten mit Darifenacin und IL-6 / ACh wurde das Medium abgesaugt und die Zellen jeweils mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde die Wellplatte auf Eis gestellt und 200 µl RIPA-Puffer pro Well hinzugegeben. Mit Hilfe eines Zell-Scrapers wurden die Zellen abgelöst und lysiert. Die Lysate wurden jeweils in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate bei 10.000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (Proteinextrakt), wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Analyse bei -80°C asserviert.

2.3.2. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem QuantiPro™ BCA Assay Kit. Bei der BCA-Proteinbestimmung (63) wird die maximale Extinktion eines stabilen Farbkomplexes bei 562 nm gemessen. Cu²⁺-Ionen werden durch die Reaktionen mit Proteinen zu Cu¹⁺-Ionen reduziert, die dann wiederum einen stabilen blau-violetten Farbkomplex mit Bicinchoninsäure (BCA - Reagenz) bilden.

Die Proteinextrakte wurden in Aqua dest. 1 zu 200 verdünnt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit Hilfe einer BSA-Standardlösungen (6, 25, 12,5, 25, 50 µg/µl) berechnet. Zuerst wurde 100 µl QuantiPro™-Puffer-Lösung in einer 96-Wellplatte vorgelegt und anschließend wurden 100 µl BSA-Standardlösungen sowie Proteinextrakte hinzugefügt. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte in einer Doppelbestimmung. Die Proben wurden im Inkubator bei 60 °C für 1 Stunde inkubiert und anschließend wurde die Extinktion bei 550 nm im Mikrotiterplattenreader gemessen.

2.3.3. Western Blot-Analysen

2.3.3.1. SDS - Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Proteine wurde eine Gel-Elektrophorese nach Laemmli durchgeführt (64). Verwendet wurde dabei das Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell System. In der vorliegenden Arbeit wurde eine wässrige 40%ige Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 19:1 verwendet, die für die

Herstellung 7,5%iger und, 10%iger Trenngele sowie 5%iger Sammelgele verdünnt wurde. Dabei wurde die Polymerisation mit Zugabe des Radikalbildners Ammoniumpersulfat (APS, 10%) sowie des Radikal-Stabilisators TEMED induziert. Nachdem die Gele in die Elektrophoresekammer gesetzt wurden, wurde der Elektrophorese-Puffer angegossen. Die zu analysierenden Proben wurden mit 5x Laemmli Puffer für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Das Detergenz-Sodiumdodecylsulfat (SDS) im Laemmli-Puffer denaturiert die Proteine, sodass diese im elektrischen Feld nur nach Proteinmasse aufgetrennt werden. Außerdem dient Bromphenolblau der Farbkontrolle der Laufstrecke. In dieser Arbeit wurden 20-30 µg Protein in einem Volumen von 25 µl pro Tasche geladen. Ein Protein-Molecular-Weight-Marker (Molekulargewicht kDa: 170, 130, 100, 72, 55, 40, 33, 24, 17 und 11) diente zur Bestimmung des Molekulargewichtes der aufgetrennten Proteine und wurde mit einem Volumen von 20 µl eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer elektrischen Spannung von 100 V durchgeführt.

2.3.3.2. Proteintransfer auf PVDF-Membranen (Tank-Blot-Verfahren)

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine elektrophoretisch vom Gel auf eine PVDF-Membran transferiert, um die Detektion der Proteine durch Antikörper zu ermöglichen. Vor dem Transfervorgang wurde das Gel im Transferpuffer für 15 Minuten inkubiert. Dabei diente das Methanol im Transferpuffer der Entfernung von SDS aus dem Gel. Die PVDF-Membran wurde mit absolutem Ethanol aktiviert und anschließend mit Whatman-Filterpapieren sowie Schwämmen in Transferpuffer inkubiert. Wie in Abbildung. 5 gezeigt, wurden 2 Schwämme, 2 Whatman-Filterpapiere, PVDF-Membran sowie das Gel in angegebener Reihenfolge geschichtet und mögliche Luftblasen ausgestrichen. Der Transfer erfolgte im Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell System in eiskalten Transferpuffer bei 100 V für 1-2 Stunde. Je nach Proteingröße wurde die Zeitangabe wie in Tabelle 8 angepasst. Um eine Überhitzung beim Blotvorgang zu vermeiden, wurde ein Kühlakku verwendet. Beim zweistündigen Blotvorgang wurde der Kühlakku nach einer Stunde gewechselt. Mit Hilfe eines Magnetrührers wurde für eine gleichmäßige Kühlung gesorgt. Nach der Gelelektrophorese wurde die Membran für 10 Minuten mit TBS/T-Lösung gewaschen und anschließend mit 5%iger-BSA-Lösung für 2 Stunde auf einem Schüttler bei Raumtemperatur blockiert.

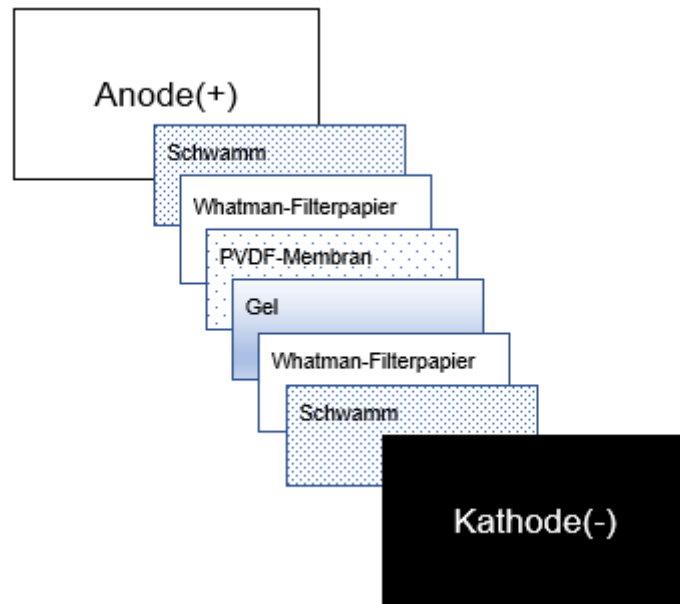


Abbildung 5: Aufbau beim Tankblot-Verfahren

Tabelle 8: Transferzeit nach Proteinmasse

Protein	Proteinmasse	Transferzeiteingabe
ERK1/2	42-44 kDa	1 Stunde
AKT-1	60 kDa	1 Stunde
P38	40 kDa	1 Stunde
mTOR	289 kDa	2 Stunde
Src	60 kDa	1 Stunde
JNK	46, 54 kDa	1 Stunde

2.3.3.3. Immundetektion von Proteinen

Die auf die PVDF-Membran transferierten Proteine können nun durch spezifische Antikörper identifiziert werden. Die Inkubation des Primärantikörpers wurde über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler durchgeführt. Dabei wurde der jeweilige Primärantikörper in einer 5%igen BSA-Lösung in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Nach der Inkubationszeit wurde die Membran mit TBS/T-Lösung dreimal jeweils für 10 Minute gewaschen. Um den Primärantikörper zu detektieren, wurde ein entsprechender Sekundärantikörper in einer 1%igen Milchpulver-Lösung in TBS/T in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Bei der Detektion von β -Actin wurde der Sekundärantikörper 1:5000 verdünnt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler für 1 Stunde durchgeführt. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut dreimal mit TBS/T für jeweils 10 min gewaschen. Um die Proteine zu detektieren, wurde die PVDF-Membran mit Supersignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Bremen) für 5 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Supersignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate besteht aus einer Stable Peroxide Solution und Stable Enhancer Solution. Für die Detektion wurden beide Lösungen in gleichem Verhältnis gemischt. Die verwendeten Sekundärantikörper sind mit einer Peroxidase konjugiert, die nun eine Luminol-Reaktion katalysiert. Die entstehende Lichtemission wurde mit Hilfe der Fusion-FX7 Kamera und der Vision-Capt Software detektiert.

2.4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit Microsoft Excel durchgeführt. Die numerischen Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des t-Tests bestimmt, wobei eine statistische Signifikanz mit $p < 0,05$ angenommen wurde.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss von Darifenacin auf die Proliferation und Viabilität von HT29-Zellen

Um den Einfluss des M3R-selektiv-Antagonisten Darifenacin auf die Zellproliferation in HT29 zu untersuchen, wurde ein BrdU-Assay durchgeführt. Das Ergebnis des BrdU-Assays zeigt, dass die Proliferationsrate der Zellen durch 10 μM Darifenacin reduziert werden konnte ($n = 4$; $p < 0.01$ versus Kontrolle). Während die Proliferationsrate bei den naiven Zellen durch 10 μM Darifenacin ca. 50 % reduziert wurde, wurde die Proliferation der mit ACh stimulierten HT29-Zellen durch 10 μM Darifenacin um ca. 60% reduziert. Jedoch hatte eine niedrige Dosierung von Darifenacin mit 1 μM keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsrate (Abbildung 6).

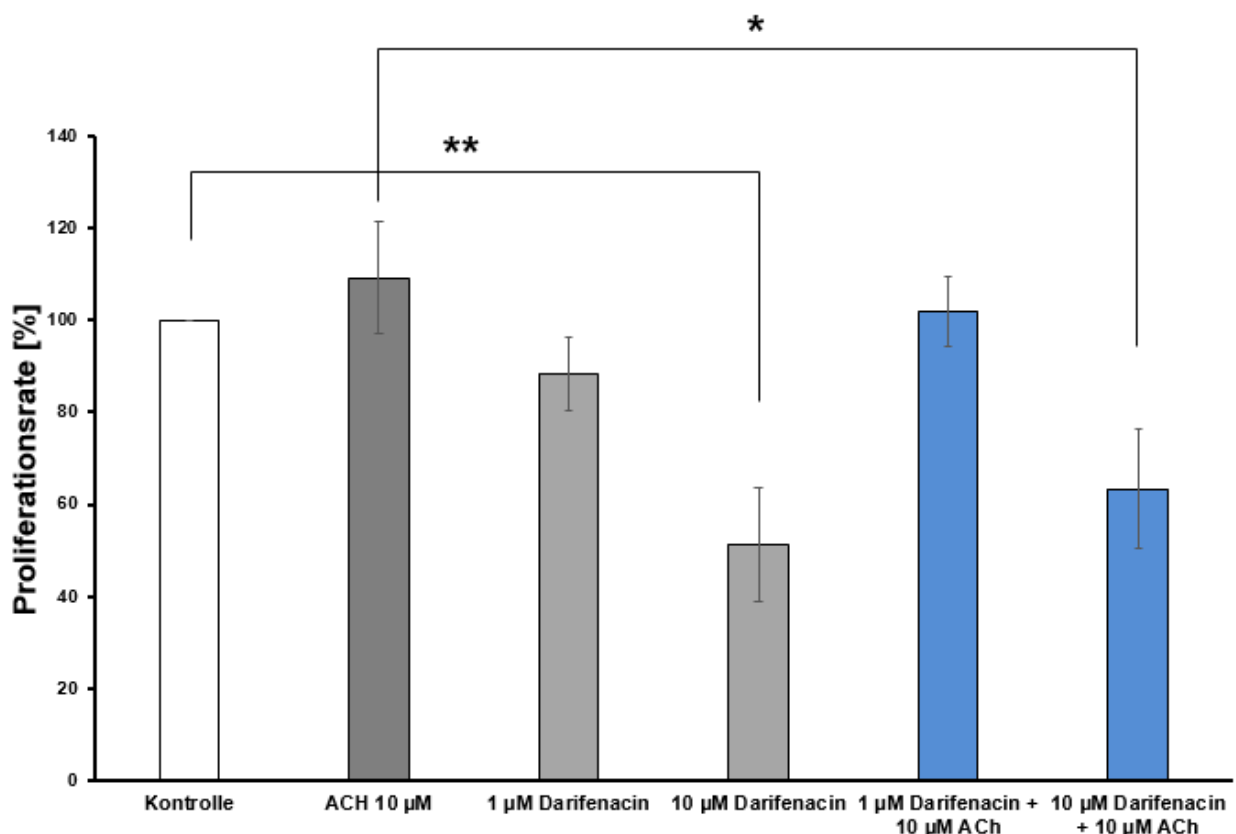


Abbildung 6: Proliferationsrate der HT29-Zellen Die HT29-Zellen wurden erst mit Darifenacin 1 μM , 10 μM oder ohne Darifenacin inkubiert. Nach einer Stunde wurde 10 μM ACh oder kein ACh hinzugefügt. Nach der Substanzgabe wurden die Zellen für 48 Stunden inkubiert. In den mit ACh stimulierten HT29 Zellen wurde die Zellproliferation durch 10 μM Darifenacingabe inhibiert. Die Proliferationsrate der HT29-Zellen, die zuvor nicht durch ACh stimuliert wurden, konnte durch 10 μM Darifenacin gehemmt werden (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n = 5$).

Um den Einfluss von Darifenacin auf die Viabilität der HT29 zu untersuchen, wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Die Menge von 10 μM Darifenacin konnte auf die Viabilität der HT29-Zellen einen stark hemmenden Einfluss bringen. Bei den HT29-Zellen wurde mit einer zusätzlichen ACh-Gabe auf 10 μM Darifenacin eine Reduktion der Zellviabilität um 40% beobachtet. 1 μM Darifenacin konnte keine signifikante hemmende Wirkung auf die Zellen entfalten (Abbildung 7).

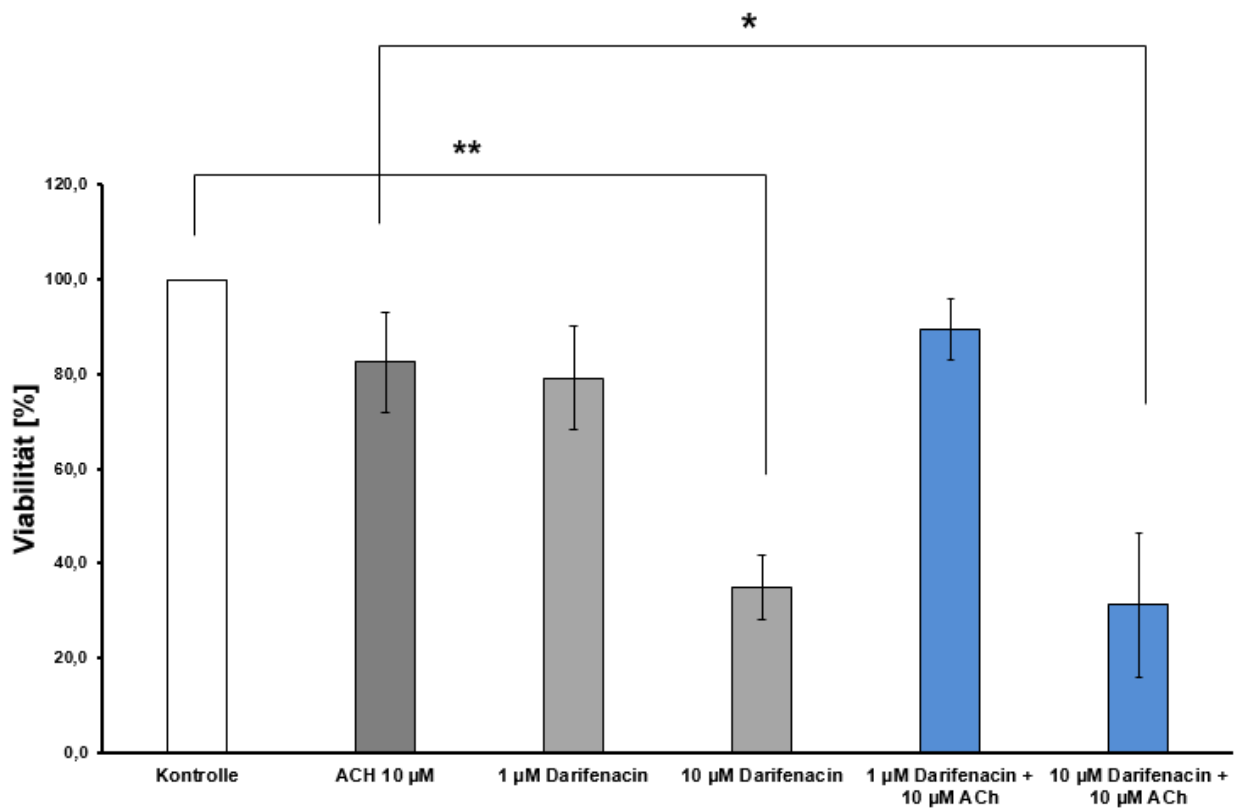
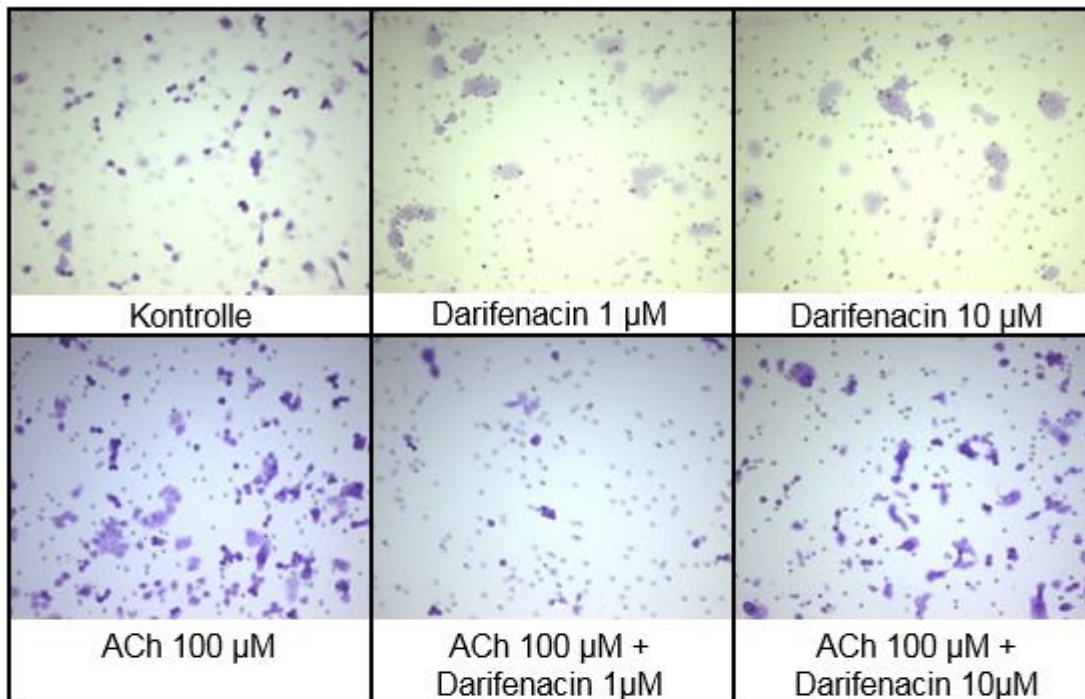


Abbildung 7: Viabilität der HT29-Zellen Für MTT-Assay ist die Darifenacin-/ACh-Gabe der HT29-Zellen wie beim BrdU-Assay erfolgt. In den ACh gegebenen Zellen wurde die Zellviabilität durch 10 μM Darifenacingabe inhibiert. Die Zellviabilität, die zuvor nicht durch ACh stimuliert wurde, konnte durch 10 μM Darifenacin gehemmt werden (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n = 4$).

3.2. Einfluss von Darifenacin auf das Invasionsverhalten von HT29-Zellen

Um den Einfluss von Darifenacin auf das invasive Verhalten der HT29-Zellen zu klären, wurde ein Invasionsassay durchgeführt. Dabei wurde zuerst die Invasion der HT29-Zellen durch ACh-Gabe stimuliert. Dabei verdoppelte ACh die Invasionsrate der HT29-Zellen. Dieses konnte durch 1 μ M Darifenacin signifikant gehemmt werden. Jedoch wurde kein wesentlicher Einfluss von 10 μ M Darifenacin auf die Zellinvasion beobachtet (Abbildung 8a und 8b).

a)



b)

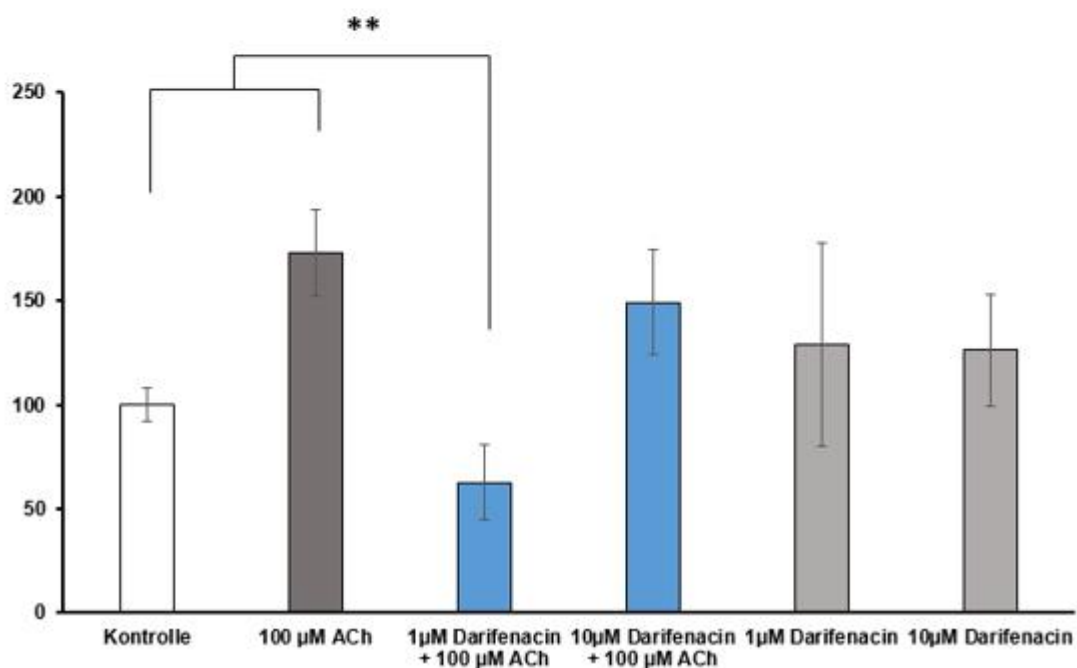


Abbildung 8: Einfluss von Darifenacin auf die Invasion der HT29-Zellen a) Repräsentative Aufnahme der in das Matrigel eingewanderten Zellen (mit Crystal-Violett gefärbt, 20X vergrößert). b) Die durch das Matrigel gewanderten Zellen wurden unter dem Mikroskop gezählt und der Mittelwert der in das Matrigel eingewanderten Zellen grafisch dargestellt. Die ACh-Gabe stimulierte die Invasion der HT29-Zellen zweifach. Dies konnte durch 1 µM Darifenacin signifikant gehemmt wurde (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n \geq 3$).

3.3. Veränderungen im Phosphorylierungsmuster von Signalmolekülen der M3R-Signalkaskade durch Darifenacin

Um den potentiellen Einfluss von Darifenacin auf verschiedene Signalkaskade zu untersuchen, wurden Phosphorylierungsstudien mittels Western Blot durchgeführt.

3.3.1. Einfluss von Darifenacin auf die Phosphorylierung verschiedener Kinasen in Abhängigkeit der Inkubationsdauer

Zuerst wurde die Aktivierung von verschiedenen Kinasen in HT29-Zellen nach verschiedenen Inkubationszeiten mit 10 μ M Darifenacin untersucht. Dies erfolgte ohne ACh-Gabe. Dabei induzierte Darifenacin die Phosphorylierung der ERK1/2-Kinase. Die maximale Phosphorylierung zeigte sich bei einer Inkubationszeit von 30 bis 60min (Abbildung 9).

Die Western-Blot-Untersuchungen zur Phosphorylierung von p38 und Akt1 zeigten ähnliche Ergebnisse wie die für die ERK1/2-Kinase. Eine Phosphorylierung von p38, Akt1 und Src zeigte sich ab einer zwanzigminütigen Inkubation mit Darifenacin (10 μ M). Die Phosphorylierung von Src wurde durch die Inkubation mit 10 μ M Darifenacin ab 10 Minuten beobachtet. Dies ging ab 60 Minuten zurück (Abbildung 9).

Es wurden jedoch kein wesentlicher Einfluss von Darifenacin auf die Phosphorylierung von JNK und mTOR beobachtet (Abbildung 9).

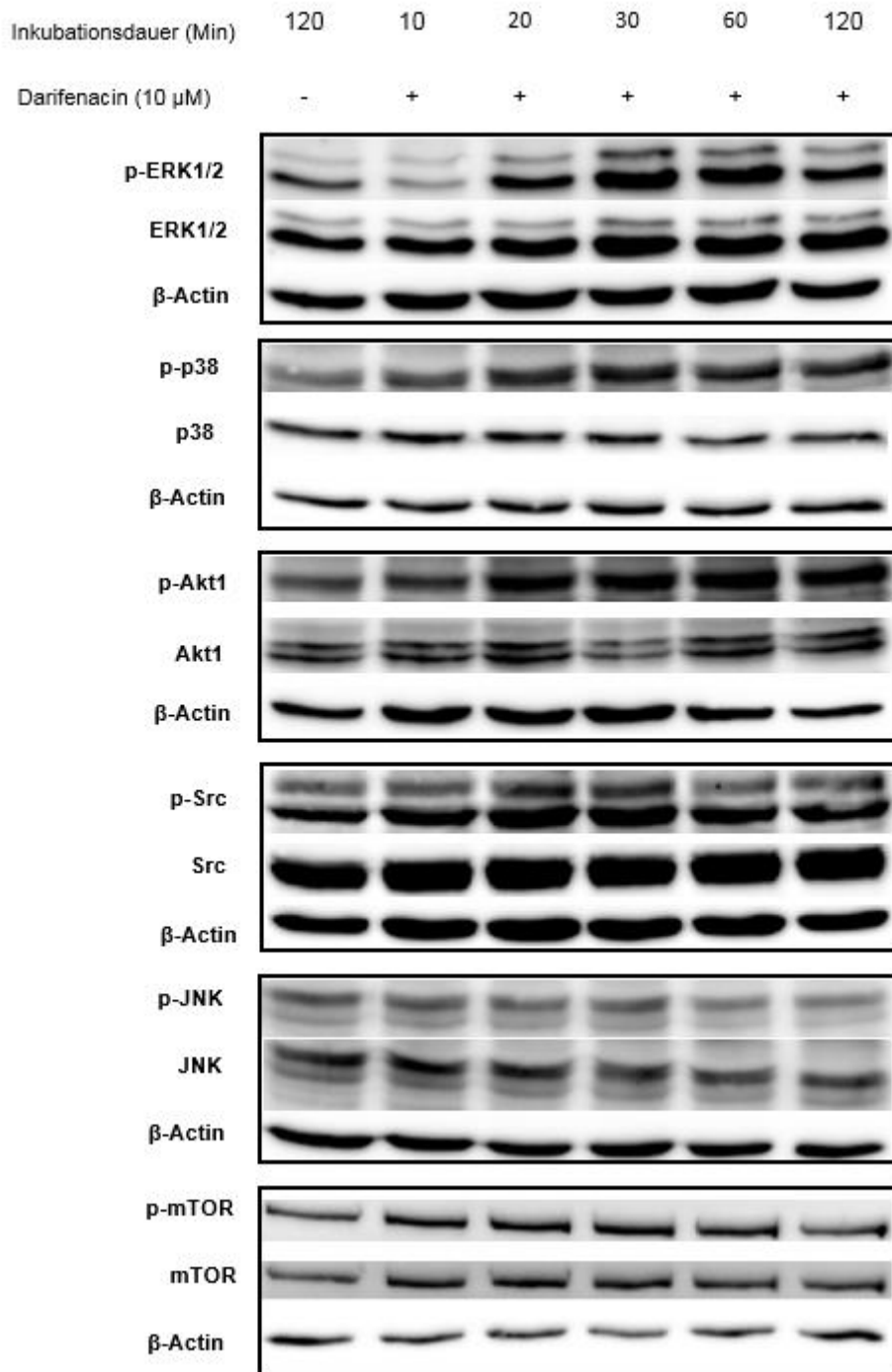


Abbildung 9: Einfluss von Darifenacin auf die Phosphorylierung verschiedener Kinasen in Abhängigkeit der Inkubationsdauer Die Inkubation erfolgte mit 10 μ M Darifenacin. ERK1/2 wurde zeitabhängig phosphoryliert. Bei einer Inkubationsdauer ab 120 Minuten ging dieser Effekt von Darifenacin wieder zurück (n = 3). Eine Phosphorylierung von p38 und Akt1 wurde erst ab einer Inkubationsdauer von 20 Minuten mit Darifenacin beobachtet. Die Phosphorylierung wurde zeitabhängig stimuliert (n= 3). Die Phosphorylierung von Src wurde durch die Inkubation mit 10 μ M Darifenacin ab 10 Minuten beobachtet. Dies ging ab 60 Minuten zurück. Bei JNK und mTOR konnte man während der Inkubationsdauer bis zur 120. Minute keine Phosphorylierung durch Darifenacin beobachten.

3.3.2. Einfluss von Darifenacin auf eine durch Acetylcholin induzierte Phosphorylierung verschiedener Kinasen

In einem weiteren Versuchsansatz wurde eine potentiell inhibitorische Wirkung von Darifenacin auf eine durch ACh stimulierte Phosphorylierung von ERK1/2, p38, Akt1 und Src untersucht.

3.3.2.1. Extrazelluläre signalregulierte Kinase 1/2 (ERK1/2)

ACh konnte die Phosphorylierung von ERK1/2 in HT29 um 165 % \pm 19,7 gegenüber der unstimulierten Kontrolle erhöhen. Unter diesen Bedingungen konnte 1 μ M Darifenacin die Phosphorylierung von ERK1/2 inhibieren (Abbildung 10a und 10b). Jedoch zeigte sich bei der Gabe von 0,1 μ M oder 10 μ M Darifenacin keine signifikante Inhibierung der ACh-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung (Abbildung 10a und 10b). Die unphosphorylierte Form der ERK1/2 wurde weder durch Ach noch durch Darifenacin beeinflusst.

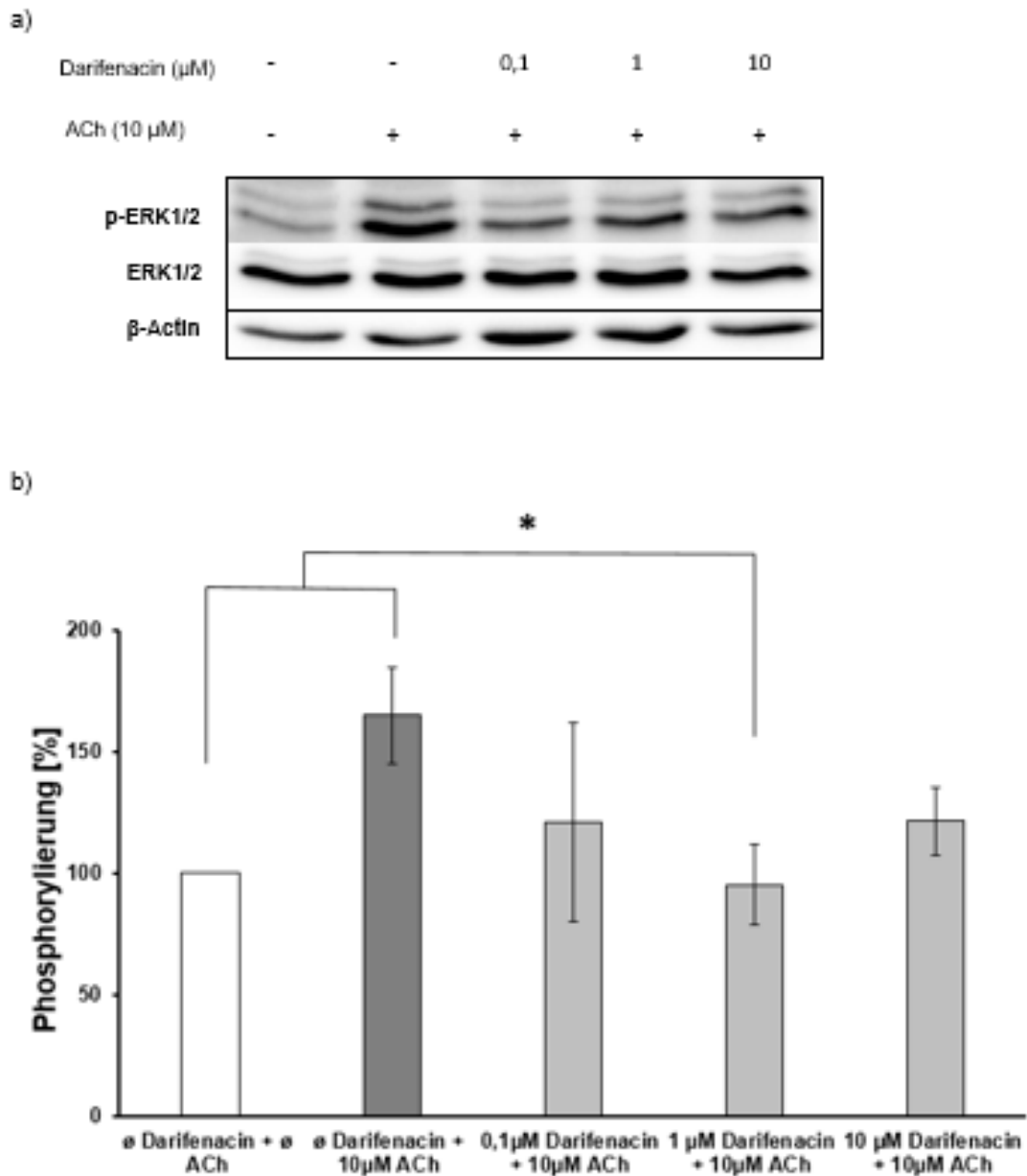


Abbildung 10: Einfluss von Darifenacin auf die durch ACh-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 a) Repräsentative Western Blots und b) die densitometrische Quantifizierung zeigen eine verstärkte Phosphorylierung von ERK 1/2 durch ACh ($p < 0.05$, $n = 4$), die durch $1 \mu\text{M}$ Darifenacin inhibiert werden konnte ($p < 0.05$, $n = 4$). Die densitometrisch ermittelten Werte sind prozentual dargestellt. Die Werte der unphosphorylierten Kontrolle wurden hierfür auf 100% gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM.

3.3.2.2. p38

Wie in Abbildung 11a und 11b gezeigt, induzierte ACh die Phosphorylierung von p38 um $425 \% \pm 82,8$. Darifenacin konnte dieses inhibieren. Dabei waren bereits Konzentrationen ab $0,1 \mu\text{M}$ Darifenacin effektiv. Dieser inhibitorische Effekt zeigte sich ebenfalls bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$. Die Level der unphosphorylierten Form der p38 Kinase blieben konstant.

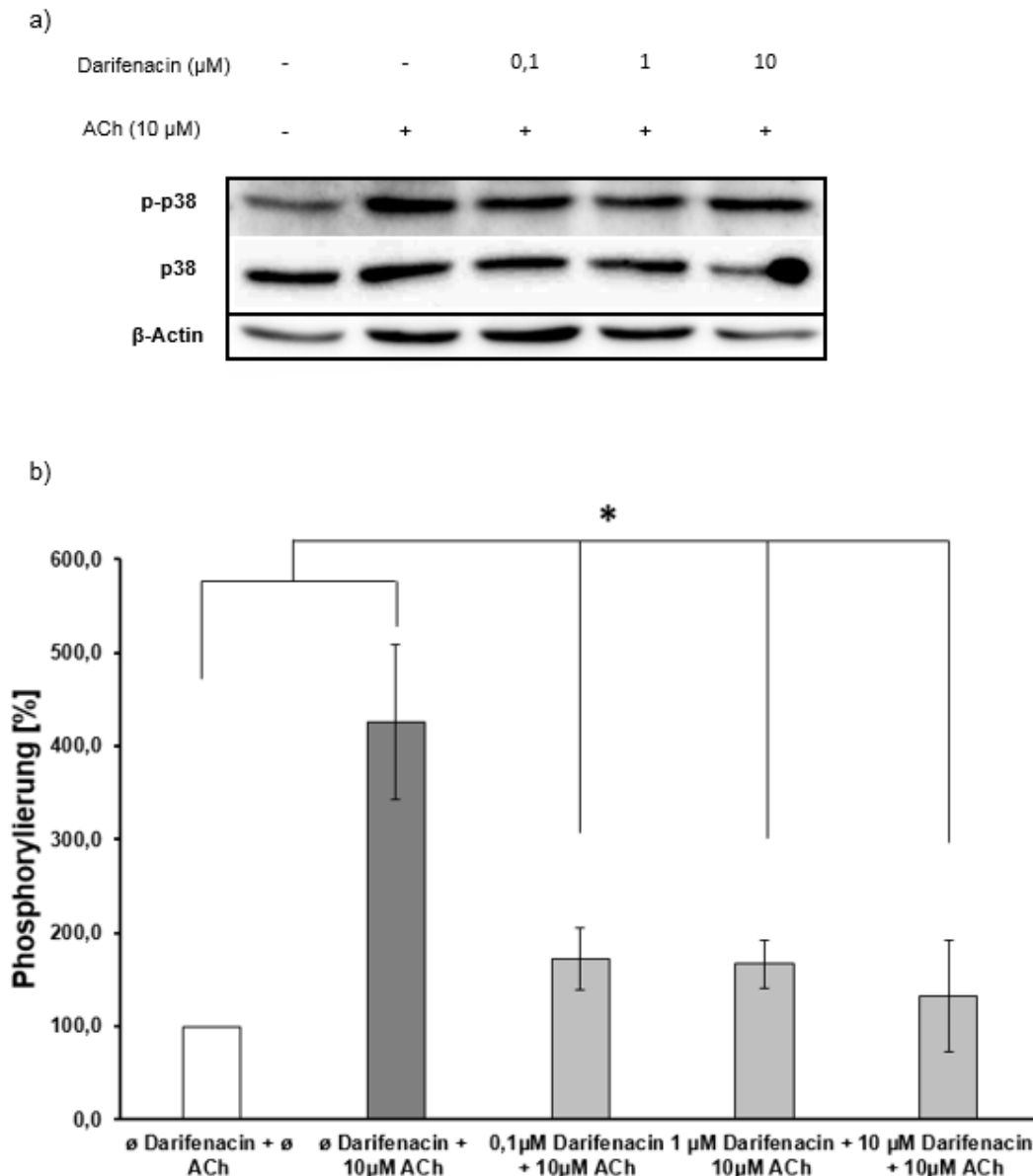


Abbildung 11: Einfluss von Darifenacin auf die durch ACh-induzierte Phosphorylierung von p38 a) Representative Western Blots und b) die densitometrische Quantifizierung zeigen eine ca. 4-fach verstärkte Phosphorylierung von p38 durch ACh ($p < 0,05$, $n = 4$), die durch alle getesteten Konzentrationen von Darifenacin ($0,1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$) inhibiert werden konnte ($p < 0,05$, $n = 5$). Die densitometrisch ermittelten Werte sind prozentual dargestellt. Die Werte der unphosphorylierten Kontrolle wurden hierfür auf 100% gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM.

3.3.2.3. Proteinkinase B (Akt1)

ACh konnte die Phosphorylierung von Akt1 in HT29 um $211,8 \% \pm 31,8$ gegenüber der unstimulierten Kontrolle erhöhen. Unter diesen Bedingungen konnten $0,1 \mu\text{M}$ und $1 \mu\text{M}$ Darifenacin die Phosphorylierung von Akt1 inhibieren (Abbildung 12a und 12b). Jedoch zeigte sich bei der Gabe von $10 \mu\text{M}$ Darifenacin keine signifikante Inhibierung der ACh-induzierten Akt1-Phosphorylierung. Die unphosphorylierte Form der Akt1 wurde weder durch ACh noch durch Darifenacin beeinflusst.

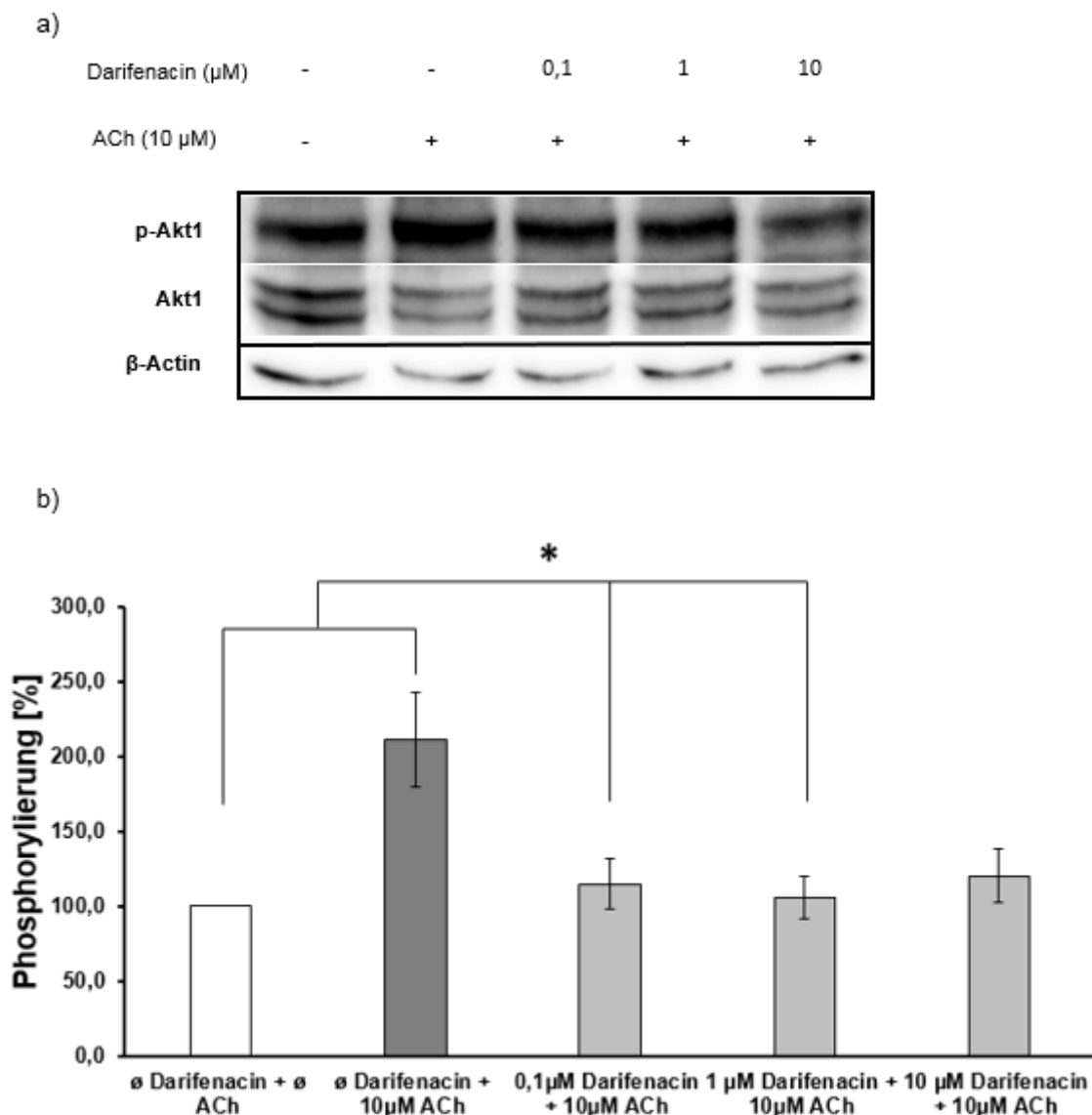


Abbildung 12: Einfluss von Darifenacin auf die durch ACh-induzierte Phosphorylierung von Akt1 a) Representative Western Blots und b) die densitometrische Quantifizierung zeigen eine verstärkte Phosphorylierung von Akt1 durch ACh ($p < 0,05$, $n = 4$), die durch $0,1 \mu\text{M}$ und $1 \mu\text{M}$ Darifenacin inhibiert werden konnte ($p < 0,05$, $n = 4$). Die densitometrisch ermittelten Werte sind prozentual dargestellt. Die Werte der unphosphorylierten Kontrolle wurden hierfür auf 100% gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM.

3.3.2.4. Src

In den HT29-Zellen zeigte sich kein wesentlicher Effekt auf die Aktivierung von Src durch ACh-Gabe. Einsatz von Darifenacin konnte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Src bringen (Abbildung 13a und 13b). Die unphosphorylierte Form der Src wurde weder durch ACh noch durch Darifenacin beeinflusst.

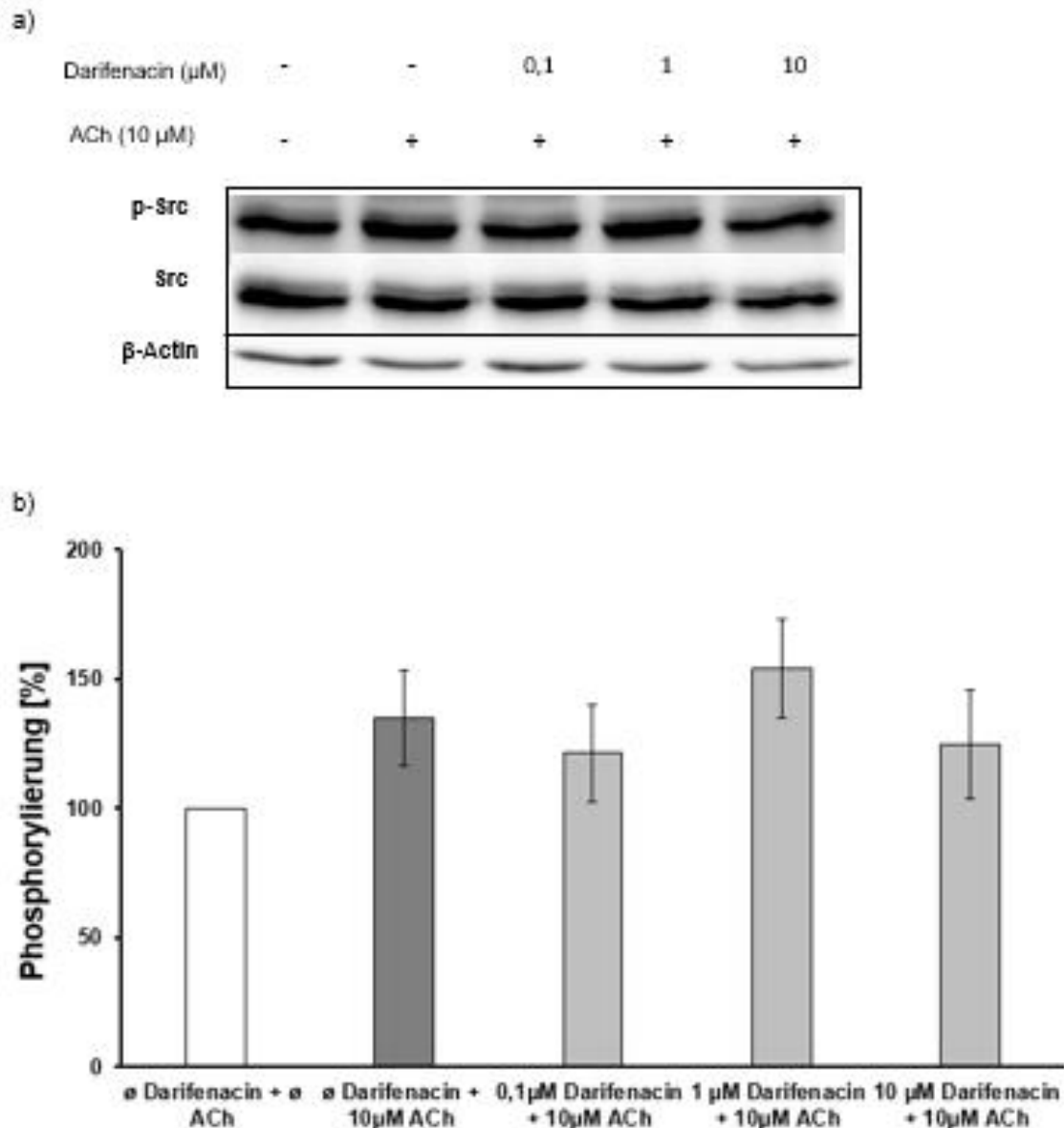


Abbildung 13: Einfluss von Darifenacin auf die Phosphorylierung von Src durch ACh und Darifenacin a) Representative Western Blots und b) die densitometrische Quantifizierung zeigen keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Src durch ACh ($p < 0.05$, $n = 4$). Darifenacin zeigte keine signifikante Wirkung bei der Phosphorylierung von Src ($p < 0.05$, $n = 4$). Die densitometrisch ermittelten Werte sind prozentual dargestellt. Die Werte der unphosphorylierten Kontrolle wurden hierfür auf 100% gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM.

4. Diskussion

Trotz der aktuellen Therapiemöglichkeiten für das Kolonkarzinom liegt die 5-Jahresüberlebensrate des metastasierten Kolonkarzinoms unter 10% (4). Neue Therapieansätze zusätzlich zum aktuellen Therapieschema sind für die Behandlung des Kolonkarzinoms im fortgeschrittenen Stadien nötig. In bisher veröffentlichten Forschungsarbeiten zum Kolonkarzinom wurde der Einfluss der Signaltransduktion über den M3R auf die Proliferation, das Wachstum sowie Invasivität der Tumorzellen untersucht. Diese ergab erste Hinweise darauf, dass sich der M3R-Antagonismus als ein möglicher Therapieansatz eignen könnte (14). Dabei wurden insbesondere die Signalkaskaden von ERK1/2, p38 und Akt1 über die Transaktivierung von EGFR durch M3R Aktivierung erforscht. In bisherigen Studien wurde als M3R-Antagonist Atropin verwendet (44, 16, 19). Dabei konnte Atropin die Proliferation und Invasion der Kolonzellkarzinomzelllinien inhibieren. Neben Atropin wurden als M3R-Antagonist 1,1-dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidinium-Iodid (4-DAMP) oder p-Fluoro-hexahydrosiladifenidol (p-F-HHSiD) für die Untersuchungen verwendet. Diese M3R-Antagonisten inhibierten die Proliferation von MKN45/BGC823 Magenkarzinom- sowie H82 Lungenzellkarzinomzelllinien signifikant (49, 43).

Der Einfluss von Darifenacin auf die Signaltransduktion über M3R ist bisher unbekannt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der Fragestellung nachgegangen, ob Darifenacin in der Kolonkarzinomzelllinie HT29 die Proliferation, die Viabilität sowie die Zellinvasion beeinflusst und welche der intrazellulären M3R-Signalkaskaden durch Darifenacin aktiviert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass 10 μM Darifenacin die Proliferationsrate und Viabilität von HT29-Zellen und 1 μM Darifenacin die durch ACh stimulierte Zellinvasion hemmen. Die durch ACh induzierte Phosphorylierung von ERK1/2, Akt1 und p38 wurden durch Darifenacin inhibiert. In Abwesenheit von ACh induzierte Darifenacin die Phosphorylierung von ERK1/2, Akt1 und p38. In vorliegender Arbeit wurde festgestellt, dass die JNK- und mTOR-Signalkaskaden nicht durch Darifenacin beeinflusst werden.

Wie bereits in verschiedenen Studien gezeigt (15-17, 42), ist die Signaltransduktion über den M3R für die Proliferation von Tumorzellen von Bedeutung. In Forschungsarbeiten, die dies zeigen, wurden MTT-Assays oder Sulforhodamin-B Assay (SRB-Assay)

verwendet. Der MTT-Assay spiegelt die Viabilität der Zellen wider, wohingegen der SRB-Assay die Proteinmasse zur Zellproliferation in Beziehung setzt (65). Beide Methoden werden häufig zu einer indirekten Messung der Zellproliferation angewendet. Die in dieser Arbeit verwendete Methode für Proliferationsuntersuchung, der BrdU-Assay, unterscheidet sich grundsätzlich von den vorher erwähnten Methoden, indem direkt die Vermehrung der DNA nach Zellproliferation gemessen wird (61). In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich, dass Darifenacin sowohl die Proliferation als auch die Viabilität von Kolonkarzinomzellen inhibiert.

Die Gabe von 10 μM Acetylcholin (ACh) stimulierte weder die Proliferation der HT29-Zellen beim BrdU-Assay noch die Zellviabilität beim MTT-Assay in dieser Arbeit.

Frucht et al. konnten bei der Zellproliferationsuntersuchung mit der Kolonkarzinomzelllinie H508 zeigen, dass eine statistisch signifikante Erhöhung der Zellproliferation durch Carbamylcholin-Gabe erst bei einer Konzentration über 30 μM möglich war (15). In der SNU-407 Kolonkarzinomzelllinie wurde die Erhöhung der Zellproliferation mit 1mM Carbachol erreicht (16, 17). Neben den Kolonkarzinomzelllinien wurde eine Zellproliferation in Magenzelllinien (MKN45/BGC823) durch ACh-Gabe mit Konzentration erst über 50 μM beobachtet (43). Darüber hinaus wurde die mit 10 μM Carbachol stimulierte Zellproliferation in der Lungenkarzinomzelllinie H82 erst nach neun Tagen Inkubation beobachtet (48). Vor diesem Hintergrund kann als Grund für die ausbleibend Stimulation der HT29-Zellen durch ACh in dieser Arbeit entweder die vergleichsweise niedrige Konzentration und geringe Inkubationsdauer angenommen werden. Wahrscheinlicher ist jedoch die Annahme, dass ein potentieller Einfluss von ACh sich bei bereits aktivierten intrazellulären Signalwegen nicht zusätzlich messbar auf die Proliferation und das Überleben der Tumorzellen auswirkt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Proliferationsrate und Viabilität von HT29-Zellen durch 10 μM Darifenacin deutlich reduziert werden konnte. Dies konnte sowohl für mit ACh stimulierte Zellen als auch für naive Zellen beobachtet werden.

Dass M3R-Antagonisten die Zellproliferation hemmen, wurde in verschiedenen Karzinomzelllinien nachgewiesen. Bei einem SRB-Assay wurde die Zelldichte, d.h. Zellproliferation, von H508 Kolonzelllinie signifikant reduziert, nachdem die Zellen mit 300 μM Acetylcholin und 5 μM Atropin für 5 Tage inkubiert wurden (12). Bei einem MTT-Assay von der SNU-407 Kolonzellkarzinomzelllinie konnte der M3R-Antagonist Atropin die

Zellproliferation signifikant hemmen. Dabei wurden die SNU-407 Zellen mit 1 mM Carbachol sowie 10 μ M Atropin für 48 Stunden inkubiert (17). Außerdem wurde das Zellwachstum der T84 Kolonzelllinie mittels MTT-Assay untersucht. Dabei wurde nachgewiesen, dass 100 μ M Carbachol das Zellwachstum stark induziert und 4-DAMP, ein M3R-Antagonist, das induzierte Zellwachstum inhibieren konnte (20).

Neben den Proliferationsuntersuchungen der Kolonzellkarzinomzelllinien gibt es Studien, in denen der Einfluss der M3R-Antagonisten auf die Proliferationsrate der Zellen von anderen Organen untersucht wurde. Beschrieben sind Versuche, in denen Darifenacin das Tumorwachstum in Prostatageweben und die Zellproliferation in Magenkarzinomzelllinien und in Lungenkarzinomzelllinien hemmen konnte (40, 49, 51, 43). Bei der Proliferationsuntersuchung des orthotopen Magenkarzinom-Xenograft-Mausmodells wurde der Einfluss von Darifenacin und 4-DAMP gezeigt. Dabei wurde bei den mit Darifenacin und 4-DAMP injizierten Mäusen eine deutlich kleinere Tumorgröße in Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (43). Auch der Einfluss des M3R Antagonisten Darifenacin auf das Prostatakarcinomgewebe wurde bei einem Xenograft-Mausmodell untersucht. Dabei konnte bei den mit Darifenacin behandelten Mäusen ein deutlich kleinerer Tumor in Vergleich zu dem der Kontrollgruppe beobachtet werden (51). Außerdem konnte Atropin die durch ACh induzierte Proliferation der H82 Lungenkarzinomzelllinie signifikant inhibieren (49). In neuralen Zelllinien konnte die durch ACh stimulierte Zellproliferation durch Atropin inhibiert werden (24, 40).

Die deutliche Hemmung der Zellproliferation und Viabilität von HT29-Zellen durch den M3R-Antagonisten Darifenacin, wie sie im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurde, stimmen daher mit den in anderen Tumorentitäten beobachteten Effekten überein. Daraus kann einerseits bestätigt werden, dass M3R in der Regulation der Zellproliferation und -viabilität in der HT29-Zelllinie involviert ist, andererseits wird die Möglichkeit der effektiven Inhibition der Zellproliferation und -viabilität der HT29-Zellen durch Darifenacin deutlich.

Wie bereits aus früheren Forschungsarbeiten, die sich mit der Metastasierung des Magen- oder Lungenkarzinoms beschäftigten, bekannt ist, spielt die Aktivierung des M3R eine wichtige Rolle, sofern die Invasion und Migration der Zellen durch ACh induziert wird (66, 50). Die Rolle des M3R bei der Metastasierung des Kolonkarzinoms, wurde in den letzten Jahren von der Arbeitsgruppe Raufman detailliert erforscht (44, 67, 19). Zum

einen wurde dabei nachgewiesen, dass Zellmigration und -invasion der Kolonkarzinomzelllinien H508 und HT29 von der Aktivierung des M3Rs und EGFRs abhängig sind. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass ERK1/2 und PI3K-Akt1 Signalkaskade *via* M3R und EGFR für die Zellmigration verantwortlich sind. Die Metastasierung wird über die Aktivierung der p38-Signalkaskade ermöglicht, wie in weiteren Untersuchungen gezeigt werden konnte (67). Sie ist für die Zellinvasion verantwortlich, indem sie die Expression von MMP1 erhöht, die zum Abbau von extrazellulärer Matrix führt.

In den Invasionsassays, die in vorliegender Arbeit durchgeführt wurden, zeigte sich zur Invasionstendenz von HT29-Zellen, dass ACh stark invasionsfördernd wirkt und die Anzahl der eingewanderten Zellen ca. 1,2-fach erhöht wurde. Wurde in diesem Experimenten 1 μ M Darifenacin zugegeben, wiesen die Zellen ein signifikant schwächeres Invasionsverhalten auf. Eine erhöhte Darifenacin-Konzentration von 10 μ M führte nicht zu einer signifikanten Hemmung der Zellinvasion.

Der hemmende Einfluss von M3R-Antagonisten auf die Invasion der Tumorzellen wurde in mehreren Studien nachgewiesen. Die Arbeitsgruppe Raufman zeigte, dass 100 μ M ACh die Invasion der HT29- und H508-Kolonkarzinomzellen induzierte (44, 19) und durch 5 μ M Atropin gehemmt werden konnte. Allerdings hatte eine alleinige Gabe von Atropin keinen Einfluss auf die Zellinvasion (19). Bei dem Invasionsassay von Magenkarzinomzelllinien MKN45 und MGC803 wurde eine induzierte Zellinvasion durch 10 μ M ACh beschrieben. 10 μ M Darifenacin konnte in beiden Zelllinien die durch ACh stimulierte Zellinvasion inhibieren (50).

Zusammenfassend zeigte der Invasionsassay der vorliegenden Arbeit, dass die Invasion der HT29-Zellen durch ACh induzierbar wird und durch den M3-selektiven Antagonisten Darifenacin effektiv gehemmt werden kann. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen des obengenannten Invasionsassays überein.

Warum in vorliegender Arbeit 10 μ M Darifenacin eine geringere Hemmung der Zellinvasion als 1 μ M Darifenacin gezeigt hat, ist unklar und wurde in dieser Arbeit nicht weiterführend untersucht. Allerdings beschreiben verschiedene Studien an Herz, Lunge und Gehirn, dass eine höhere Konzentration eines muskarinischen Rezeptor-Antagonisten eine niedrigere Wirkung oder Gegenwirkung haben kann, als niedrigere Konzentrationen (68-70). Beispielsweise induzierte eine chronische Therapie mit dem

muskarinischen Rezeptor-Antagonisten Atropin bis zu 4 Wochen die Zunahme der Rezeptoranzahl in der trachealen glatten Muskulatur von Kaninchen, was als eine mögliche Ursache einer cholinergen Reaktion nach einer langfristigen Asthmatherapie mit muskarinischen Rezeptor-Antagonisten interpretiert wird (70). In der Hirnrinde und dem dorsalen Hippocampus von Ratten konnte eine 14 tägige Atropingabe die Rezeptordichte um 24% erhöhen (66). Außerdem konnte eine Inkubation mit Atropin oder N-methylscopolamin für 1-8 Stunden die M1R-M3R mRNAs in kortikostriatalen Neuronen hochregulieren (71). Bei einem anderen Versuch in der Herzkammerwand von Kaninchen erhöhte eine dosisabhängige Atropingabe die Anzahl der muskarinischen Rezeptoren (69). Diese Erkenntnisse könnten eine Erklärung für die niedrigen Effekte höherer Dosierung des M3R Antagonisten Darifenacin auf die Zellinvasion sein. Weitere Studien zum Klären dieser Hypothese sind hier nötig, insbesondere im Hinblick auf dosierungsabhängig unterschiedliche Wirkungen.

Bei den Western Blot-Untersuchungen, in denen der zeitabhängige Effekt von Darifenacin in HT29-Zellen ohne ACh-Stimulation untersucht wurde, wirkte der M3R-Antagonist Darifenacin nicht inhibitorisch, sondern zeigte eine vermehrte Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK1/2, Akt1 und p38.

Im Gegensatz dazu hatte Darifenacin jedoch eine inhibitorische Wirkung, wenn mit Acetylcholin stimuliert wurde. Dabei inhibierte Darifenacin die durch ACh-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2, Akt1 und p38. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Experimenten überein, welche die Involvierung von ERK1/2, Akt1 und p38 als wichtige Signalwege in verschiedenen Karzinomzelllinien gezeigt haben (12).

Warum in der vorliegenden Untersuchung eine Darifenacingabe ohne ACh-Stimulation in Western-Blot-Untersuchungen die Phosphorylierung von ERK1/2, Akt1 und p38 nicht inhibiert hat, sondern nach der zunehmenden Inkubationsdauer verstärkt hat, ist unklar und wurde in dieser Arbeit nicht weiterführend untersucht.

Inwiefern diese Effekte für biologische Parameter der Tumorprogression relevant sein können, bedarf weiterer Untersuchungen. Jedoch sollte eine Korrelation zwischen ACh-Stimulation bzw. -Konzentration und dem Einfluss von Darifenacin geklärt werden, denn Darifenacin konnte in HT29-Zellen ohne ACh-Stimulation einen inversen Effekt hervorrufen, was als eine therapeutische Einschränkung betrachtet werden müsste.

Neben der Hypothese, dass Darifenacin dosis- oder inkubationsdauerabhängig eine andere Wirkung haben kann, könnte auch die Eigenschaft von Darifenacin eine Erklärung für den inversen Effekt von Darifenacin in vorliegender Arbeit anbieten. Darifenacin besitzt eine hohe Affinität an M3R, allerdings bindet Darifenacin auch an M1R mit einer niedrigeren Affinität. Es ist noch unklar und nicht nachgewiesen, ob die Aktivierung von M1R auf die M3R-Signalkaskade Einfluss hat. Um diese Effekte zu erklären, sind weitere Experimente, beispielsweise mit selektiven M1R-Antagonisten erforderlich (72).

Die Western Blot-Untersuchungen zu Src in dieser Arbeit zeigten unterschiedliche Ergebnisse abhängig von der Anwesenheit von ACh. In Abwesenheit von ACh konnte Darifenacin die Phosphorylierung von Src erhöhen. Unter ACh-Stimulation wurde allerdings kein signifikanter Einfluss von Darifenacin auf die Src-Aktivierung gezeigt.

Die Rolle von Src im Tumor wurde mehrmals erwähnt. Es wurde berichtet, dass im Tumorgewebe bei über 80% der Patienten mit Kolonkarzinom Src überexprimiert wird (73). Außerdem wurde die Aktivierung von Src durch ACh-Stimulation in der Kolonzelllinie H508 beobachtet, dabei wurde die Rolle von Src als Mediator zwischen PKC- α und EGFR beschrieben (19). In einer Studie mit HT29 wurde gezeigt, dass 100 μ M ACh die Phosphorylierung von Src stimuliert (19). Zu Src befindet die genannte Arbeit, dass Darifenacin auf die Aktivierung von Src keinen Einfluss hatte. Dies könnte eventuell an einer nicht ausreichenden Stimulationsdauer oder eine zu niedrigen ACh-Konzentration liegen. Warum Darifenacin auf die Phosphorylierung von Src in den mit ACh stimulierten HT29-Zellen keinen Einfluss zeigte, ist bislang ungeklärt.

Die Akt1-mTOR Signalkaskade ist ein zentraler Signalweg in der Tumorprogression und der Metastasierung beim Kolonkarzinom (23, 74). *In vitro* wurde bestätigt, dass die Akt1-mTOR-Signaltransduktion in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien (HCT116, SW480 und KM20) die Zellinvasion stimuliert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Signalkaskade von mTOR in HT29-Zellen durch den M3R-Antagonisten Darifenacin nicht beeinflusst wird. Dabei wurden die Zellen nicht mit ACh stimuliert. In dieser Arbeit wurde nicht untersucht, inwiefern ACh die mTOR-Signalkaskade aktiviert und ob Darifenacin darauf einen hemmenden Einfluss haben könnte. Allerdings ist dieses nicht auszuschließen, da festgestellt wurde, dass in den Kolonkarzinomzelllinien HT29 die PI3K-Akt1-mTOR-Signalkaskade für Zellwachstum und Metastasierung aktiv ist. (22, 23, 18). Eine andere Studie berichtet, dass eine PI3K-Akt1-NF- κ B-Signalkaskade in HT29-

Zellen zur Apoptose führt (46). Dies könnte beispielsweise darauf hinweisen, dass Darifenacin über die Signalkaskade von Akt1-NF- κ B in HT29 wirkt. Eine Aktivierung von NF κ B durch ACh bzw. Darifenacin wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) hat als eine der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) eine große Bedeutung in physiologischen Prozessen. Bis jetzt wurde die Rolle von JNK, die in der Zellproliferation, -differenzierung und dem -überleben involviert ist, in mehreren Karzinom-Studien in verschiedenen Organen wie Leber, Haut, Mamma und Gehirn diskutiert (75). In den Kolonkarzinomzelllinien RKO und HCT116 wurde die Aktivierung der JNK-Signalkaskade durch Substanzen wie Reversine und Piperlongumin beobachtet. Dabei inhibierte Reversine die Zellmigration in RKO-Zellen und Piperlongumin induzierte die Zellapoptose in HCT116-Zellen (76, 77).

In der vorliegenden Arbeit wurde keine Korrelation zwischen Darifenacin und der Aktivierung von JNK beobachtet. Dabei wurde JNK durch ACh-und/oder Darifenacingabe weder aktiviert noch inhibiert. Eine andere Studie mit HT29-Zellen zeigt, dass die JNK-Signalkaskade durch ACh- oder Atropingabe nicht beeinflusst wird, was mit dem Ergebnis dieser Arbeit übereinstimmt (19). Dies deutet darauf hin, dass JNK, zumindest im hier untersuchten experimentellen Rahmen, nicht in der Signaltransduktion *via* M3R in Kolonkarzinomzelllinien HT29 involviert ist.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit erstmalig einen Einfluss des selektiven M3R-Inhibitors Darifenacin auf M3R-abhängige zellbiologische Prozesse der Tumorprogression beim Kolonkarzinom zeigen. Darifenacin konnte die Zellproliferation, -viabilität und -invasion in HT29-Kolonkarzinomzellen inhibieren. Mechanistisch konnte eine Beteiligung der Erk1/2, Akt1 und p38-Signalwege, nicht aber von JNK, gezeigt werden. Zukünftige Experimente sollten die Effekte von Darifenacin in Abhängigkeit von der Expression von M3R auf der Tumorzelle im Fokus haben, um vorhersagen zu können, ob die molekulare Ausstattung der Karzinomzellen einen Einfluss auf eine Therapie mit M3R-Antagonisten hat, oder ob es möglicherweise auch Effekte von Darifenacin sind, die M3R-unabhängig sind. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch ein Crosstalk der M3R- und EGFR-Signalwege. In der Summe könnte Darifenacin, als bereits zugelassene, klinisch sichere Substanz im Sinne eines *drug repurposing* ein attraktiver Kandidat in der Systemtherapie des kolorektalen Karzinoms sein.

Literaturverzeichnis

1. Bosetti C, Levi F, Rosato V, Bertuccio P, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Recent trends in colorectal cancer mortality in Europe. *Int J Cancer*. 2011;129:180-191.
2. Cronin KA, Lake AJ, Scott S, Sherman RL, Noone AM, Howlader N, Henley SJ, Anderson RN, Firth AU, Ma J, Kohler BA, Jemal A. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, part I: National cancer statistics. *Cancer*. 2018;124:2785-2800.
3. Robert-Koch-Institut, Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Veröffentlichungsdatum: 29.11.2016, https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/Dateien/3_Downloads/K/Krebs/Krebsgeschehen_RKI.pdf, Zugriff: 16.05.2019.
4. Holmer C, Kreis ME. Darmkrebs — das Neueste in Diagnostik und Therapie. *MMW - Fortschritte der Medizin*. 2017 September 01:54-62.
5. Schmiegel W, Buchberger B, Follmann M, Graeven U, Heinemann V, Langer T, Nothacker M, Porschen R, Rodel C, Rosch T, Schmitt W, Wesselmann S, Pox C. S3-Leitlinie-Kolorektales Karzinom. *Z Gastroenterol*. 2017;55:1344-1498.
6. Wittekind C, Oberschmid B. TNM-Klassifikation maligner Tumoren 2010. *Der Pathologe*. 2010 September 01:333-338.
7. Hermanek P, Klassifikation der anatomischen Ausbreitung (TNM-System, Stadiengruppierung, R-Klassifikation). In: Springer Berlin Heidelberg, Hrsg. Management des Magen- und Ösophaguskarzinoms. Berlin, Heidelberg; 2004:
8. Hashiguchi Y, Hase K, Kotake K, Ueno H, Shinto E, Mochizuki H, Yamamoto J, Sugihara K. Evaluation of the seventh edition of the tumour, node, metastasis (TNM) classification for colon cancer in two nationwide registries of the United States and Japan. *Colorectal Dis*. 2012;14:1065-1074.
9. Grossi V, Peserico A, Tezil T, Simone C. p38alpha MAPK pathway: a key factor in colorectal cancer therapy and chemoresistance. *World J Gastroenterol*. 2014;20:9744-9758.
10. Yang WL, Frucht H. Cholinergic receptor up-regulates COX-2 expression and prostaglandin E(2) production in colon cancer cells. *Carcinogenesis*. 2000;21:1789-1793.
11. Cheng K, Shang AC, Drachenberg CB, Zhan M, Raufman JP. Differential expression of M3 muscarinic receptors in progressive colon neoplasia and metastasis. *Oncotarget*. 2017;8:21106-21114.

12. Cheng K, Zimniak P, Raufman JP. Transactivation of the epidermal growth factor receptor mediates cholinergic agonist-induced proliferation of H508 human colon cancer cells. *Cancer Res.* 2003;63:6744-6750.
13. Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 2005;6:322-327.
14. Felton J, Hu S, Raufman JP. Targeting M3 Muscarinic Receptors for Colon Cancer Therapy. *Curr Mol Pharmacol.* 2018;11:184-190.
15. Frucht H, Jensen RT, Dexter D, Yang WL, Xiao Y. Human colon cancer cell proliferation mediated by the M3 muscarinic cholinergic receptor. *Clin Cancer Res.* 1999;5:2532-2539.
16. Park YS, Cho NJ. EGFR and PKC are involved in the activation of ERK1/2 and p90 RSK and the subsequent proliferation of SNU-407 colon cancer cells by muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Cell Biochem.* 2012;370:191-198.
17. Park YS, Cho NJ. Enhanced proliferation of SNU-407 human colon cancer cells by muscarinic acetylcholine receptors. *BMB Rep.* 2008;41:803-807.
18. Park YS, Liu Z, Vasamsetti BM, Cho NJ. The ERK1/2 and mTORC1 Signaling Pathways Are Involved in the Muscarinic Acetylcholine Receptor-Mediated Proliferation of SNU-407 Colon Cancer Cells. *J Cell Biochem.* 2016;117:2854-2863.
19. Said AH, Hu S, Abutaleb A, Watkins T, Cheng K, Chahdi A, Kuppusamy P, Saxena N, Xie G, Raufman JP. Interacting post-muscarinic receptor signaling pathways potentiate matrix metalloproteinase-1 expression and invasion of human colon cancer cells. *Biochem J.* 2017;474:647-665.
20. Ukegawa JI, Takeuchi Y, Kusayanagi S, Mitamura K. Growth-promoting effect of muscarinic acetylcholine receptors in colon cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003;129:272-278.
21. Von Rosenvinge EC, Raufman JP. Muscarinic receptor signaling in colon cancer. *Cancers (Basel).* 2011;3:971-981.
22. Chen J, Shao R, Li F, Monteiro M, Liu JP, Xu ZP, Gu W. PI3K/Akt/mTOR pathway dual inhibitor BEZ235 suppresses the stemness of colon cancer stem cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2015;42:1317-1326.
23. Gulhati P, Bowen KA, Liu J, Stevens PD, Rychahou PG, Chen M, Lee EY, Weiss HL, O'Connor KL, Gao T, Evers BM. mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer Res.* 2011;71:3246-3256.

24. Greenwood JM, Dragunow M. M3 muscarinic receptors promote cell survival through activation of the extracellular regulated kinase (ERK1/2) pathway. *Eur J Pharmacol.* 2010;640:38-45.
25. van Koppen CJ, Kaiser B. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol Ther.* 2003;98:197-220.
26. Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol.* 2008;154:1558-1571.
27. Moro E, Crema F, Dandolo C, De Ponti F, Frigo G. Effect of muscarinic receptor blockade on canine gastric tone and compliance in vivo. *Pharmacol Res.* 2005;51:289-296.
28. Xie G, Drachenberg C, Yamada M, Wess J, Raufman JP. Cholinergic agonist-induced pepsinogen secretion from murine gastric chief cells is mediated by M1 and M3 muscarinic receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;289:G521-529.
29. de Ponti F, Einaudi A, Cosentino M, D'Angelo L, Lecchini S, Frigo GM, Crema A. Differential effects of antimuscarinic agents on intestinal motility in the conscious dog. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;264:789-794.
30. Cheng K, Xie G, Khurana S, Heath J, Drachenberg CB, Timmons J, Shah N, Raufman JP. Divergent effects of muscarinic receptor subtype gene ablation on murine colon tumorigenesis reveals association of M3R and zinc finger protein 277 expression in colon neoplasia. *Mol Cancer.* 2014;13:77.
31. Khan MR, Anisuzzaman AS, Semba S, Ma Y, Uwada J, Hayashi H, Suzuki Y, Takano T, Ikeuchi H, Uchino M, Maemoto A, Ushikubi F, Muramatsu I, Taniguchi T. M1 is a major subtype of muscarinic acetylcholine receptors on mouse colonic epithelial cells. *J Gastroenterol.* 2013;48:885-896.
32. DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol.* 2007;69:483-510.
33. Oldham WM, Hamm HE. Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Q Rev Biophys.* 2006;39:117-166.
34. Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science.* 1991;252:802-808.
35. Hanlon CD, Andrew DJ. Outside-in signaling--a brief review of GPCR signaling with a focus on the Drosophila GPCR family. *J Cell Sci.* 2015;128:3533-3542.
36. Milligan G, Kostenis E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol.* 2006;147:46-55.

37. Deng H, Sun H, Fang Y. Label-free cell phenotypic assessment of the biased agonism and efficacy of agonists at the endogenous muscarinic M3 receptors. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2013;68:323-333.
38. Hulme EC, Birdsall NJ, Buckley NJ. Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1990;30:633-673.
39. Deng H, Wang C, Su M, Fang Y. Probing biochemical mechanisms of action of muscarinic M3 receptor antagonists with label-free whole cell assays. *Anal Chem*. 2012;84:8232-8239.
40. Ma W, Maric D, Li B-s, Hu Q, Andreadis JD, Grant GM, Liu Q-Y, Shaffer KM, Chang YH, Zhang L, Pancrazio JJ, Pant HC, Stenger DA, Barker JL. Acetylcholine stimulates cortical precursor cell proliferation in vitro via muscarinic receptor activation and MAP kinase phosphorylation. *European Journal of Neuroscience*. 2000;12:1227-1240.
41. Danielsen SA, Eide PW, Nesbakken A, Guren T, Leithe E, Lothe RA. Portrait of the PI3K/AKT pathway in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1855:104-121.
42. Raufman JP, Shant J, Guo CY, Roy S, Cheng K. Deoxycholytaurine rescues human colon cancer cells from apoptosis by activating EGFR-dependent PI3K/Akt signaling. *J Cell Physiol*. 2008;215:538-549.
43. Yu H, Xia H, Tang Q, Xu H, Wei G, Chen Y, Dai X, Gong Q, Bi F. Acetylcholine acts through M3 muscarinic receptor to activate the EGFR signaling and promotes gastric cancer cell proliferation. *Scientific Reports*. 2017;7:40802.
44. Belo A, Cheng K, Chahdi A, Shant J, Xie G, Khurana S, Raufman JP. Muscarinic receptor agonists stimulate human colon cancer cell migration and invasion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;300:G749-760.
45. Hong DH, Forstner JF, Forstner GG. Protein kinase C-epsilon is the likely mediator of mucin exocytosis in human colonic cell lines. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1997;272:G31-G37.
46. Shant J, Cheng K, Marasa BS, Wang JY, Raufman JP. Akt-dependent NF-kappaB activation is required for bile acids to rescue colon cancer cells from stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res*. 2009;315:432-450.
47. Williams MR, Lindqvist SM, Hermon JM, Sharp PA, Johnson IT. Stimulation of acetylcholine muscarinic receptors activates MAP kinase-dependent cell proliferation in HT29 human colonic epithelial cells via the calcium signalling pathway. *Gastroenterology*. 2001;120:A496.

48. Song P, Sekhon HS, Jia Y, Keller JA, Blusztajn JK, Mark GP, Spindel ER. Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63:214-221.
49. Song P, Sekhon HS, Lu A, Arredondo J, Sauer D, Gravett C, Mark GP, Grando SA, Spindel ER. M3 muscarinic receptor antagonists inhibit small cell lung carcinoma growth and mitogen-activated protein kinase phosphorylation induced by acetylcholine secretion. *Cancer Res.* 2007;67:3936-3944.
50. Yang T, He W, Cui F, Xia J, Zhou R, Wu Z, Zhao Y, Shi M. MACC1 mediates acetylcholine-induced invasion and migration by human gastric cancer cells. *Oncotarget.* 2016;7:18085-18094.
51. Wang N, Yao M, Xu J, Quan Y, Zhang K, Yang R, Gao WQ. Autocrine Activation of CHRM3 Promotes Prostate Cancer Growth and Castration Resistance via CaM/CaMKK-Mediated Phosphorylation of Akt. *Clin Cancer Res.* 2015;21:4676-4685.
52. Becher KF. [Pharmacotherapy of urinary incontinence in the elderly]. *Internist (Berl).* 2016;57:390-398.
53. Wallis RM, Napier CM. Muscarinic antagonists in development for disorders of smooth muscle function. *Life Sci.* 1999;64:395-401.
54. Chapple C, DuBeau C, Ebinger U, Rekeda L, Viegas A. Darifenacin treatment of patients \geq 65 years with overactive bladder: results of a randomized, controlled, 12-week trial. *Curr Med Res Opin.* 2007;23:2347-2358.
55. Chapple CR. Darifenacin: a novel M3 muscarinic selective receptor antagonist for the treatment of overactive bladder. *Expert Opin Investig Drugs.* 2004;13:1493-1500.
56. Golding JF, Wesnes KA, Leaker BR. The effects of the selective muscarinic M3 receptor antagonist darifenacin, and of hyoscine (scopolamine), on motion sickness, skin conductance & cognitive function. *Br J Clin Pharmacol.* 2018;84:1535-1543.
57. Kay G, Crook T, Rekeda L, Lima R, Ebinger U, Arguinzoniz M, Steel M. Differential effects of the antimuscarinic agents darifenacin and oxybutynin ER on memory in older subjects. *Eur Urol.* 2006;50:317-326.
58. Song P, Sekhon HS, Fu XW, Maier M, Jia Y, Duan J, Proskosil BJ, Gravett C, Lindstrom J, Mark GP, Saha S, Spindel ER. Activated cholinergic signaling provides a target in squamous cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 2008;68:4693-4700.
59. Schild HO. pA, a new scale for the measurement of drug antagonism. 1947. *Br J Pharmacol.* 1997;120:29-46; discussion 27-28.

60. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
61. Crane AM, Bhattacharya SK. The use of bromodeoxyuridine incorporation assays to assess corneal stem cell proliferation. *Methods Mol Biol*. 2013;1014:65-70.
62. Gratzner HG, Leif RC, Ingram DJ, Castro A. The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes. *Exp Cell Res*. 1975;95:88-94.
63. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150:76-85.
64. Backman L, Persson K. The No-Nonsense SDS-PAGE. *Methods Mol Biol*. 2018;1721:89-94.
65. Orellana EA, Kasinski AL. Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *Bio Protoc*. 2016;6.
66. Xu R, Shang C, Zhao J, Han Y, Liu J, Chen K, Shi W. Activation of M3 muscarinic receptor by acetylcholine promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion via EGFR/PI3K/AKT pathway. *Tumour Biol*. 2015;36:4091-4100.
67. Raufman JP, Cheng K, Saxena N, Chahdi A, Belo A, Khurana S, Xie G. Muscarinic receptor agonists stimulate matrix metalloproteinase 1-dependent invasion of human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;415:319-324.
68. Wall SJ, Yasuda RP, Li M, Ciesla W, Wolfe BB. Differential regulation of subtypes m1-m5 of muscarinic receptors in forebrain by chronic atropine administration. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;262:584-588.
69. Wise BC, Shoji M, Kuo JF. Decrease or increase in cardiac muscarinic cholinergic receptor number in rats treated with methacholine or atropine. *Biochem Biophys Res Commun*. 1980;92:1136-1142.
70. Witt-Enderby PA, Yamamura HI, Halonen M, Lai J, Palmer JD, Bloom JW. Regulation of airway muscarinic cholinergic receptor subtypes by chronic anticholinergic treatment. *Mol Pharmacol*. 1995;47:485-490.
71. Brusa R, Gamalero SR, Genazzani E, Eva C. In primary neuronal cultures muscarinic m1 and m3 receptor mRNA levels are regulated by agonists, partial agonists and antagonists. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*. 1995;289:9-16.

72. Alabaster VA. Discovery & development of selective M3 antagonists for clinical use. *Life Sci.* 1997;60:1053-1060.
73. Chen J, Elfiky A, Han M, Chen C, Saif MW. The role of Src in colon cancer and its therapeutic implications. *Clin Colorectal Cancer.* 2014;13:5-13.
74. Seeliger H, Guba M, Koehl GE, Doenecke A, Steinbauer M, Bruns CJ, Wagner C, Frank E, Jauch K-W, Geissler EK. Blockage of 2-Deoxy-D-Ribose-Induced Angiogenesis with Rapamycin Counteracts a Thymidine Phosphorylase-Based Escape Mechanism Available for Colon Cancer under 5-Fluorouracil Therapy. *Clin Cancer Res.* 2004;10:1843-1852.
75. Bubici C, Papa S. JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. *Br J Pharmacol.* 2014;171:24-37.
76. Jemaa M, Abassi Y, Kifagi C, Fezai M, Daams R, Lang F, Massoumi R. Reversine inhibits Colon Carcinoma Cell Migration by Targeting JNK1. *Sci Rep.* 2018;8:11821.
77. Li W, Wen C, Bai H, Wang X, Zhang X, Huang L, Yang X, Iwamoto A, Liu H. JNK signaling pathway is involved in piperlongumine-mediated apoptosis in human colorectal cancer HCT116 cells. *Oncol Lett.* 2015;10:709-715.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Rayoung Kim, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Einfluss von Darifenacin auf die tumorspezifische Signaltransduktion in der Kolonkarzinomzelllinie HT29** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. Hendrik Seeliger, der mir die Mitwirkung an dem der gegenwärtigen Arbeit zugrundeliegenden Forschungsprojekt ermöglichte und die Entstehung dieser Arbeit fortwährend unterstützte.

Bei Dr. rer. nat. Nina Hering, meiner Betreuerin, möchte ich mich herzlich bedanken für ihre jederzeitige Ansprechbarkeit und leidenschaftliche Diskussionsbereitschaft, die Unterstützung aller experimentellen Arbeiten bis zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Zudem bin ich dem Leiter Prof. Dr. med. Martin Kreis dankbar, dessen stete Förderung wissenschaftlichen Engagements die Voraussetzung für exzellente Forschungsbedingungen am Forschungslabor für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie der Charité schuf.

Nicht zuletzt bin ich den medizinisch-technischen Mitarbeitern im Forschungslabor der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Gefäßchirurgie, Charité – Campus Benjamin Franklin, Marco Arndt und Elisabeth Hahn, für Ihre umfangreiche und zeitintensive Unterstützung bei den für diese Arbeit erforderlichen Experimente sehr dankbar.

Datum

Unterschrift