

3. Summary

Cellular stresses, such as DNA damage, lead to activation of two main responses, programmed cell death (apoptosis) and cell cycle arrest. The p53 tumor-suppressor protein has been recognized as a major determinant of both responses, since it is able to activate the intrinsic apoptotic pathway and to induce G1- and G2/M-phases arrest. The mismatch repair system (MMR) has been also described to be involved in induction of apoptosis and in mechanisms leading to G1- and G2/M-phase arrest. Sporadic colon carcinomas exhibit in 60-70% mutations in the *p53* gene and in 15-20% a MMR-deficiency [1]. In the present work, the influence of these lesions on the cellular effects caused by 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) or irinotecan (CPT-11) was investigated. For this purpose a colorectal carcinoma cell line HCT116 (which has the genotype $p53^{+/+}, hMLH1^{-}$) and the two derivative cell lines HCT116+ch3 ($p53^{+/+}, hMLH1^{+}$) and HCT116 $p53^{-/-}$ ($p53^{-/-}, hMLH1^{-}$) were used.

7-Hydroxystaurosporine (UCN-01), a new antitumor agent already evaluated in phase I clinical trial, induced in colon cancer cell lines G1-phase accumulation and apoptosis. The comparison between the HCT116 ($hMLH1^{-}$) and the HCT116+ch3 ($hMLH1^{+}$) cell lines showed that $hMLH1^{+}$ cells underwent a stronger G1-phase arrest than $hMLH1^{-}$ cells. In $hMLH1^{+}$ cells, the binding of the $p27^{KIP1}$ protein to cdk2, the consequent inhibition of the cdk2 kinase activity, and the resulting hypophosphorylation of the retinoblastoma (Rb) protein were associated with the observed G1-phase arrest. A slow and caspase-independent apoptosis occurred in these cells after 8-10 days from the start of treatment. By contrast, a percentage of $hMLH1^{-}$ cells did not arrest in G1-phase but continued the cell cycle. Passage through S- and G2/M-phases of the cell cycle rendered these cells sensitive to immediate apoptosis induced by UCN-01. Moreover, inhibition of the mitogen-activated protein (MAP kinase) pathway through inhibition of MEK1/2 proteins, enhanced the immediate apoptosis caused by UCN-01 in $hMLH1^{-}$ cells but not in $hMLH1^{+}$ cells.

The p53 protein, whose effect on UCN-01 treatment was evaluated by comparing the isogenic cell lines HCT116 ($p53^{+/+}$) and HCT116 $p53^{-/-}$ ($p53^{-/-}$), was associated with a greater sensitivity to UCN-01, concomitant with induction of apoptosis.

These data indicate: 1. UCN-01 induces a tight G1-phase arrest in hMLH1⁺ cells and a less complete G1-phase arrest, concomitant with apoptosis, in hMLH1⁻ cells; 2. The stronger G1-phase arrest in hMLH1⁺ cells is associated with binding of p27^{KIP1} to cdk2, inhibition of the cdk2 kinase activity, and hypophosphorylation of Rb protein; 3. UCN-01 targets to apoptosis hMLH1⁻ cells progressing through the S- and G2/M-phases of the cell cycle; 4. Inhibition of MEK1/2 proteins enhances UCN-01-induced apoptosis in hMLH1⁻ cells; 5. Presence of p53 protein enhances UCN-01-induced apoptosis.

Irinotecan (CPT-11), a recently introduced component of a standard chemotherapy for colorectal cancer, induces in colon cancer cell lines *in vitro* cell cycle arrest and apoptosis. CPT-11-treatment induced G2/M-phase arrest in all three cell lines investigated (p53^{+/+},hMLH1⁺; p53^{+/+},hMLH1⁻; p53^{-/-},hMLH1⁻). In the p53^{+/+},hMLH1⁺ cell line, the G2/M-phase arrest was maintained for at least twelve days. There was little concomitant apoptosis, but this was enhanced when the hMLH1 protein was absent. This enhanced apoptosis was accompanied by a shorter duration of the G2/M-phase arrest than in the hMLH1⁺ cell line. Partial abrogation of G2/M-phase arrest by caffeine enhanced apoptosis in both hMLH1⁺ and hMLH1⁻ cells.

By contrast, in the p53^{-/-} cell line, the G2/M-phase arrest was terminated within 4 days. Termination of the G2/M-phase arrest was accompanied by a high level of apoptosis detectable through poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) cleavage, DNA fragmentation, and by the appearance of cells with a DNA content <2N. The triggering of G2/M-phase arrest was accompanied in the three cell lines by a transient phosphorylation of cdc2, while the maintenance of the arrest in the p53^{+/+} cell lines was concomitant with the overexpression of p53 and p21^{CIP1} proteins, and consequently with the inhibition of cdc2 kinase activity.

These data indicate: 1. CPT-11 induces long-term arrest in p53^{+/+} cells and a short-term arrest followed by apoptosis in p53^{-/-} cells; 2. Triggering of the arrest is p53-independent, and is associated with a brief increase of phosphorylation of cdc2, while the p53-dependent maintenance of G2/M-phase arrest is associated with the inhibition

of cdc2 kinase activity by p21^{CIP1}; 3. Lack of hMLH1 protein enhances CPT-11-induced apoptosis.

In sum, the cytotoxic effect and the mechanism of action of either drug, UCN-01 or CPT-11, is dependent on p53- and MMR- status. The understanding of the effects of genetic lesions in colon carcinoma cells on the mechanism of action of the chemotherapeutic drugs may help develop rational therapies adjusted to the p53- and MMR- status of the tumor.

Zusammenfassung

Die Schädigung der DNA löst hauptsächlich zwei Reaktionen der Zelle aus: den programmierten Zelltod (Apoptose) und den Zellzyklusarrest. Das p53-Protein beeinflusst beide Reaktionen als Aktivator des intrazellulären Apoptoseweges und Regulator des G1- und G2/M-Arrestes des Zellzyklus. Die Beteiligung des Mismatch-Reparatursystems (MMR) an der Auslösung der Apoptoseinduktion sowie an G1- und G2/M-Arrest wurde ebenfalls beschrieben. Sporadische Coloncancerome weisen in 60-70% Mutationen des *p53*-Gens und in 15-20% Defekte des MMR-Systems auf [1].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss dieser beiden Läsionen auf die zellulären Effekte des 7-Hydroxystaurosporins (UCN-01) und des Irinotecan (CPT-11) untersucht. Dafür wurde die etablierte colorectale Zelllinie HCT116 (mit dem Genotyp $p53^{+/+}, hMLH1^{-}$), und die von ihr abgeleiteten Zelllinien HCT116+ch3 ($p53^{+/+}, hMLH1^{+}$) und HCT116 $p53^{-/-}$ ($p53^{-/-}, hMLH1^{-}$) benutzt.

7-Hydroxystaurosporin (UCN-01), ein neues Antitumor Agens, das sich in der Phase I der klinischen Testung befindet, induzierte in den Coloncanceromzelllinien einen G1-Phasenarrest und Apoptose. Der Vergleich zwischen den Zelllinien HCT116 ($hMLH1^{-}$) und HCT116+ch3 ($hMLH1^{+}$) zeigte, dass die $hMLH1^{+}$ Zellen einen stärkeren G1-Phasenarrest machten als die $hMLH1^{-}$ Zellen. In Der G1-Zellphasenarrest war in den $hMLH1^{+}$ -Zellen mit der Bindung des $p27^{KIP1}$ Proteins an cdk2 und der resultierenden Inhibition der cdk2-Kinaseaktivität sowie der Hypophosphorylierung des Retinoblastoma (Rb)-Proteins assoziiert. Eine Caspase-unabhängige Apoptose folgte in diesen Zellen erst nach 8-10 Tagen. Demgegenüber waren $hMLH1^{-}$ -Zellen nicht komplett arretiert, etwa 5% setzten den Zellzyklus fort. Während der S- sowie der G2/M-Phase waren diese Zellen gegenüber UCN-01 sensitiv und lösten Apoptose aus. Die Inhibition des Mitogen-aktivierten Kinase (MAP-Kinase)-Signalweges durch die Inhibition der Proteine MEK1/2 verstärkte die UCN-01 induzierte Apoptose in $hMLH1^{-}$ Zellen aber nicht in $hMLH1^{+}$ Zellen.

Der Vergleich der isogenen Zelllinien HCT116 (p53^{+/+}) und HCT116 (p53^{-/-}) nach Behandlung mit UCN-01 zeigte, dass das intakte p53-Protein die Sensitivität der Zellen gegenüber UCN-01 und die Apoptoseinduktion erhöht.

Diese Daten zeigen: 1. UCN-01 induziert einen starken G1-Zellphasenarrest in hMLH1⁺ Zellen und einen weniger kompletten Arrest sowie Apoptose in den hMLH1⁻-Zellen; 2. Der starke G1-Arrest in den hMLH1⁺ Zellen ist mit der Bindung von p27^{KIP1} an cdk2, Inhibition der cdk2 Kinaseaktivität und der Hypophosphorylierung des Rb-Proteins verbunden; 3. UCN-01 induziert Apoptose in hMLH1⁻ Zellen während der S- und G2/M-Phase des Zellzyklus; 4. Inhibition der MEK1/2-Proteine potenziert die UCN-01-induzierte Apoptose in hMLH1⁻-Zellen; 5. Intaktes p53-Protein potenziert UCN-01-induzierte Apoptose.

Irinotecan (CPT-11), das seit kurzer Zeit als Komponente der Standardchemotherapie beim Colocarzinom angewandt wird, induziert in Colocarzinomzellen *in vitro* Zellzyklusarrest und Apoptose. Die Behandlung mit CPT-11 induzierte einen G2/M-Phasenarrest in den drei Modellzelllinien (p53^{+/+},hMLH1⁺; p53^{+/+},hMLH1⁻; p53^{-/-},hMLH1⁻). Der G2/M-Phasenarrest wurde in der p53^{+/+},hMLH1⁺ Zelllinie für mindestens zwölf Tage aufrechterhalten. Die Apoptose war gering und wurde durch die Abwesenheit des hMLH1-Proteins verstärkt. Die verstärkte Apoptose von einem kürzeren G2/M-Phasenarrest als in der hMLH1⁺ Zelllinie begleitet. Partielle Aufhebung des G2/M-Phasenarrests mittels Koffein verstärkte die Apoptose sowohl in den hMLH1⁺ als auch in den hMLH1⁻-Zellen.

In der p53^{-/-}-Zelllinie dagegen wurde der G2/M-Phasenarrest innerhalb von vier Tagen beendet. Die Terminierung des G2/M-Phasenarrests war von starker Apoptose begleitet, detektierbar durch Spaltung der poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP), DNA-Fragmentierung und durch die Detektion von Zellen mit einem DNA Gehalt < 2N. Die Auslösung des G2/M Phasenarrests erfolgte in allen drei Zelllinien gleichzeitig mit der transienten Phosphorylierung des cdc2 Proteins. Die Aufrechterhaltung des Arrestes in den p53^{+/+}-Zelllinien war mit der Überexpression der p53 und p21^{CIP1}-Proteine und der Inhibition der cdc2 Kinaseaktivität durch p21 verbunden.

Diese Daten zeigen: 1. CPT-11 induziert einen lanfristigen Arrest in den p53^{+/+} Zellen und einen kurzen Arrest, gefolgt von Apoptose in p53^{-/-} Zellen; 2. Die Auslösung des Arrests ist p53-unabhängig und ist mit einer transienten Phosphorylierung des cdc2 Proteins verbunden, während die p53-abhängige Aufrechterhaltung des Arrests mit der Inhibition von cdc2 durch p21^{CIP1} assoziiert ist; 3. Die Abwesenheit des hMLH1 Proteins potenziert die CPT-11-induzierte Apoptose.

Zusammenfassend, sind die zytotoxischen Effekte und der Wirkungsmechanismus des jeweiligen Chemotherapeutikums, UCN-01 bzw. CPT-11, von dem Status des p53-Proteins und des MMR-Systems abhängig. Die Kenntnisse des Einflusses der genetischen Läsionen in Colonicarcinomen auf die Wirkungsmechanismen der Chemotherapeutika kann zur Entwicklung neuer, Läsion-angepasster Therapieschemata beitragen.