

5 Ergebnisse

5.1 Vergleich des MTT- und des klonogenen Tests zur Untersuchung des Einflusses des p21-Proteins auf die Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika

In vorangegangenen Versuchen wurde in der Arbeitsgruppe gezeigt, dass muzinöse Kolonkarzinomzellen das zellzyklusregulierende Protein p21^{CIP1} viel stärker exprimieren als nicht-muzinöse Zellen. Das p21-Protein ist für die Regulation des G1/S-Kontrollpunktes verantwortlich, und eine seiner Funktionen ist die Auslösung des G1-Arrestes nach einer DNA-Schädigung. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob eine erhöhte Expression von p21^{CIP1} der muzinösen Zelllinien mit einer veränderten Sensitivität gegenüber chemotherapeutischen Agenzien einhergeht. Zur Bestimmung des Einflusses der p21^{CIP1}-Überexpression wurden der MTT- und der klonogene Test verglichen, und die Übereinstimmung der beiden Methoden wurde überprüft. Als Modell wurden zwei Gruppen von Zellen verwendet, muzinöse und nicht-muzinöse, die mit 5-FU oder CPT-11 behandelt wurden.

Im Balkendiagramm (**Abb. 2**) sind die IC₅₀- (*inhibitory concentration*) Werte dargestellt, die Konzentrationen, bei welchen das Wachstum zu 50% inhibiert wurde. Für 5-FU lagen im MTT-Test die IC₅₀-Werte der muzinösen Zelllinien bei 84,4 µM (LS 174T) und 101,6 µM (5583-S) und die der nicht-muzinösen Zelllinien bei 13,3 µM (HT 29), 14,1 µM (DLD1) und 23,4 µM (SW480). Der Wert für die Zelllinie LoVo lag dazwischen bei 67,2 µM. Die Zelllinien 5583-S und LS 174T zeigten höhere Überlebensraten als HT 29, DLD1 und SW480 (**Abb. 1**). Somit waren im MTT-Test die muzinösen Zelllinien 5583-S und LS 174T resistenter gegenüber 5-FU als die nicht-muzinösen Zelllinien HT 29, SW480 und DLD1.

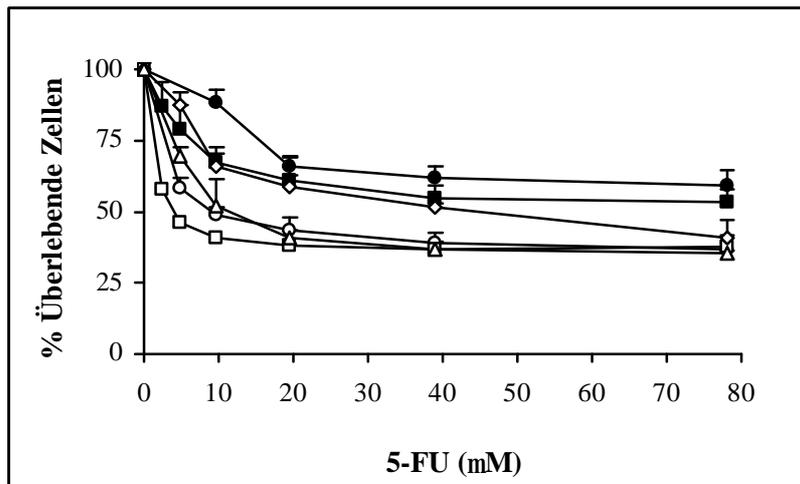


Abb. 1: Überlebensraten der muzinösen (5583-S (■), LS 174T (●)) waren höher als die der nicht-muzinösen (HT 29 (○), DLD1 (□), SW480 (△)) Zelllinien und LoVo (◇) nach Behandlung mit 5-FU (48h), bestimmt im MTT-Test. Die Abbildung zeigt ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Dargestellt sind die Mittelwerte von fünf Messwerten mit Standardabweichungen.

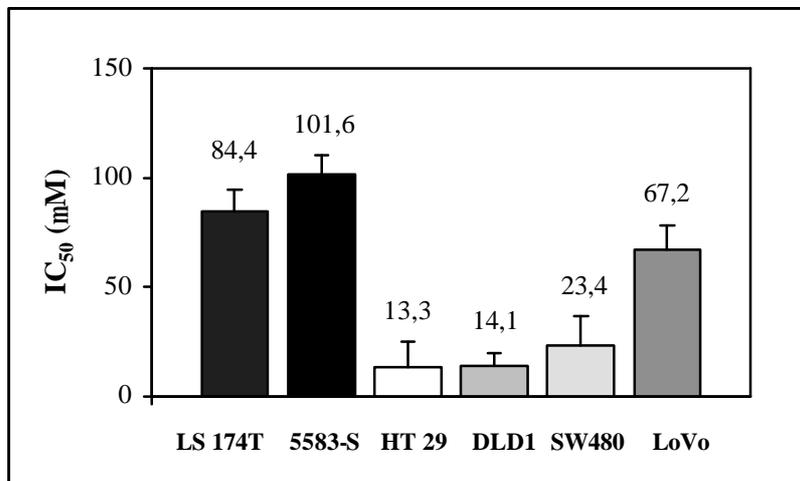


Abb. 2: IC₅₀-Werte der muzinösen waren höher als die der nicht-muzinösen Zelllinien nach Behandlung mit 5-FU, bestimmt im MTT-Test. Die Werte +/- SD wurden aus mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebniskurven berechnet.

Im klonogenen Test zeigte sich gegenüber 5-FU kein wesentlicher Unterschied in der Sensitivität muzinöser und nicht-muzinöser Zelllinien (**Abb. 3**), wenngleich die Überlebensraten von LS 174T und 5583-S am niedrigsten waren. Die im klonogenen Test bestimmten IC₅₀-Werte (**Abb. 4**) weichen von den im MTT-Test bestimmten Werten ab: Sie

lagen bei 20,3 μM für LS 174T, 78,9 μM für 5583-S, 93,0 μM für HT 29, 90,6 μM für DLD1, 107,0 μM für SW480 und 83,6 μM für LoVo. Somit unterscheiden sie sich die IC_{50} -Werte im klonogenen Test untereinander nur geringfügig. Eine Ausnahme stellte die besonders sensitive Zelllinie LS 174T dar.

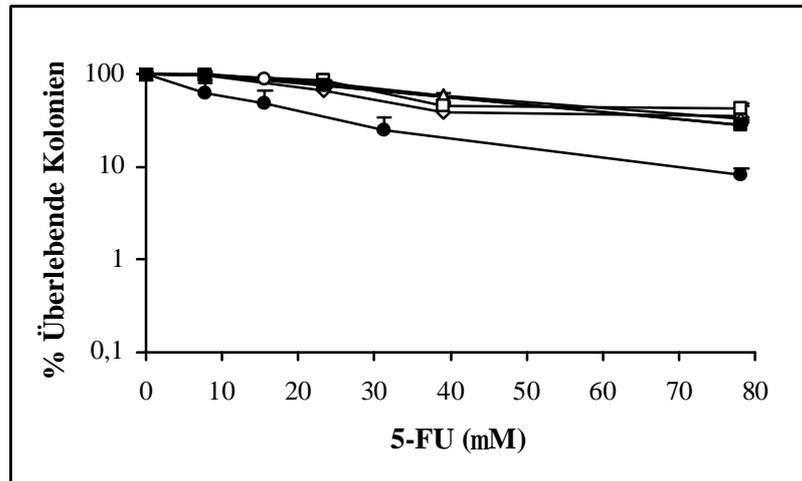


Abb. 3: Überlebensraten muzinöser (5583-S (■), LS 174T (●)) und nicht-muzinöser (HT 29 (○), DLD1 (□), SW480 (△)) Zelllinien und LoVo (◇) unterscheiden sich im klonogenen Test nur geringfügig nach Behandlung mit 5-FU. Ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Mittelwerte von drei Messwerten +/- SD.

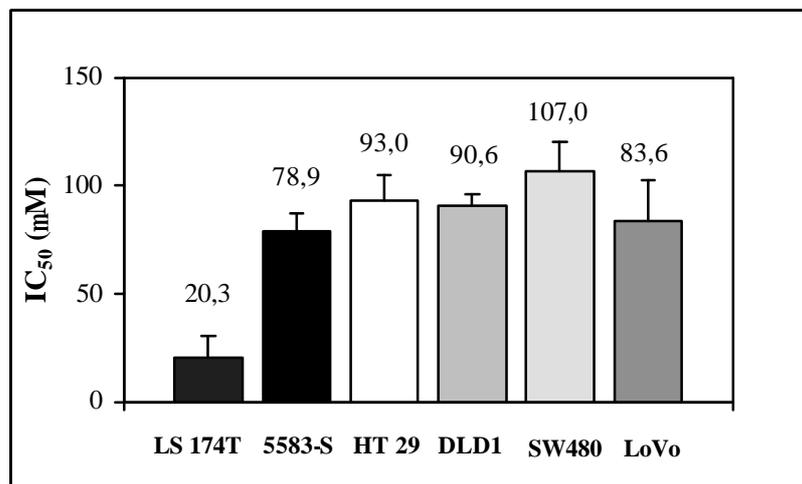


Abb. 4: IC_{50} -Werte der Zelllinien für 5-FU im klonogenen Test. Die Werte +/- SD wurden aus mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebniskurven berechnet.

Analoge Untersuchungen wurden mit CPT-11 durchgeführt. Nach der CPT-11-Behandlung betragen die IC₅₀-Werte im MTT-Test 20,4 µM für LS 174T, 43,7 µM für 5583-S, 23,1 µM für HT 29, 37,5 µM für DLD1, 26,9 µM für SW480 und 9,8 µM für LoVo (Abb. 6). Im Diagramm lagen die Kurven für 5583-S und LS 174T zwischen den Kurven für LoVo, SW480, HT 29 und DLD1 (Abb. 5). Somit war kein Unterschied in der Sensitivität muzinöser und nicht-muzinöser Zelllinien zu erkennen.

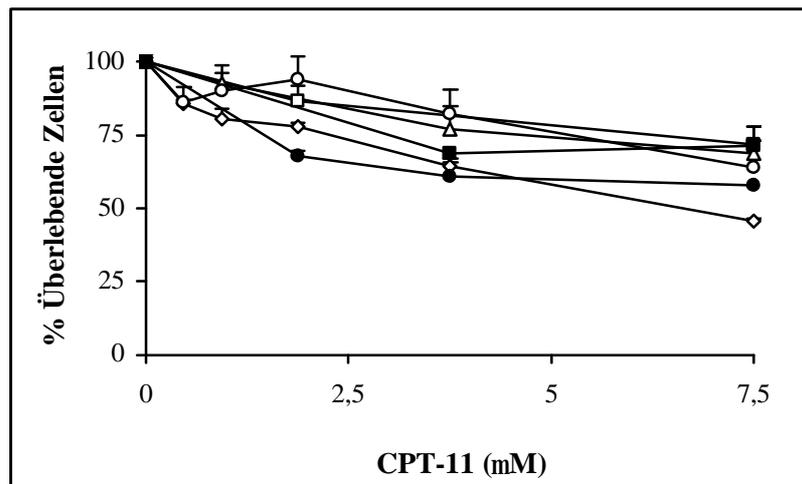


Abb. 5: Ähnliche Überlebensraten muzinöser (5583-S (■), LS 174T (●)) und nicht-muzinöser (HT 29 (○), DLD1 (□), SW480 (△)) Zelllinien und LoVo (◇) nach CPT-11-Behandlung im MTT-Test. Ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Dargestellt sind die Mittelwerte von fünf Messwerten mit Standardabweichungen.

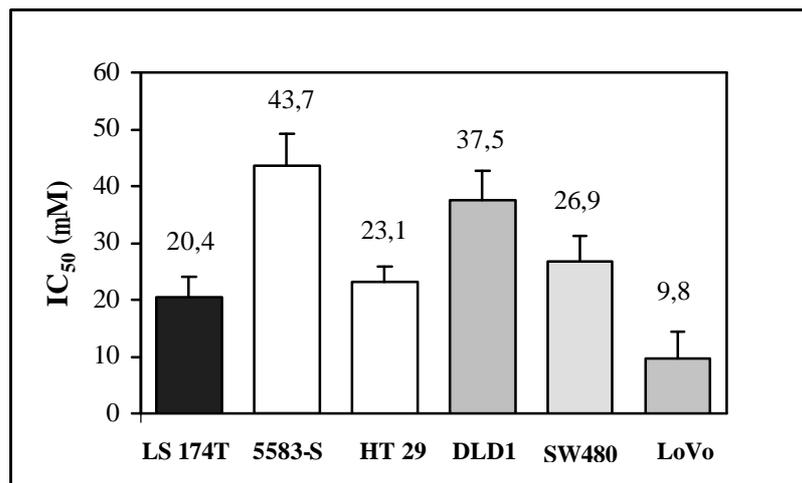


Abb. 6: IC₅₀-Werte der Zelllinien für CPT-11 im MTT-Test. Die Werte +/- SD wurden aus mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebniskurven berechnet.

Im klonogenen Test betragen die IC_{50} -Werte nach einer Behandlung mit CPT-11 2,9 $\mu\text{g/ml}$ für LS 174T, 2,2 $\mu\text{g/ml}$ für 5583-S, 0,3 $\mu\text{g/ml}$ für HT 29, 3,8 $\mu\text{g/ml}$ für DLD1, 0,8 $\mu\text{g/ml}$ für SW480 und 3,6 $\mu\text{g/ml}$ für LoVo (Abb. 8). Im Diagramm befinden sich die Kurven für 5583-S und LS 174T zwischen den Kurven für LoVo, SW480, HT 29 und DLD1 (Abb. 7). Somit war auch im klonogenen Test kein Unterschied in der Sensitivität zwischen muzinösen und nicht-muzinösen Zelllinien festzustellen.

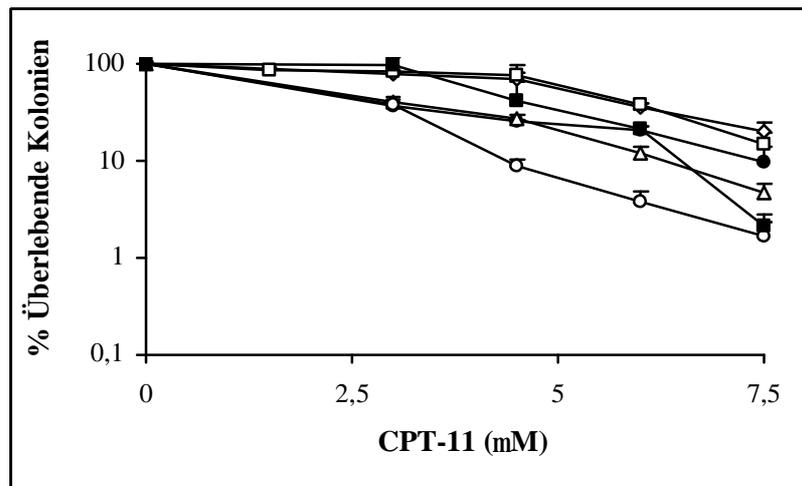


Abb. 7: Vergleichende Überlebensraten muzinöser (5583-S (■), LS 174T (●)) und nicht-muzinöser (HT 29 (○), DLD1 (□), SW480 (△)) Zelllinien und LoVo (◇) gegenüber CPT-11 im klonogenen Test. Ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Mittelwerte von drei Messwerten +/- SD.

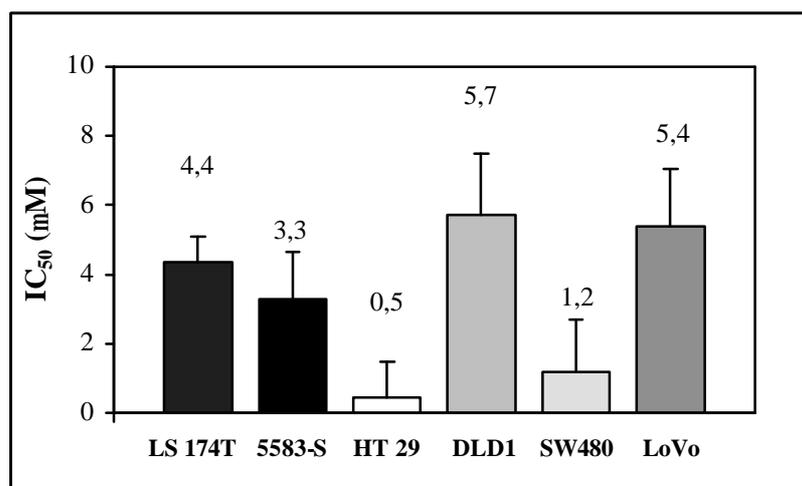


Abb. 8: IC_{50} -Werte der Zelllinien für CPT-11 im klonogenen Test. Die Werte wurden aus mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebniskurven berechnet.

Zusammenfassung:

1. Der MTT-Test und der klonogene Test liefern unterschiedliche Aussagen: Der MTT-Test zeigt die Gesamtüberlebensrate im Zeitraum bis zur Messung. Der klonogene Test weist die Zahl der überlebenden Zellen nach, die die Fähigkeit zur Koloniebildung besitzen. Die Proliferationsrate, die anhand der Koloniegröße zu sehen ist, wird nicht berücksichtigt.
2. Gegenüber 5-FU waren in einem kurzen Zeitraum (MTT-Test) die untersuchten muzinösen Zelllinien resistenter, langfristig (klonogener Test) konnte kein konsistenter Unterschied festgestellt werden.
3. Gegenüber CPT-11 zeigte sich in beiden Tests kein Unterschied in der Sensitivität muzinöser und nicht-muzinöser Zelllinien.
4. Demzufolge war kein Zusammenhang zwischen dem Phänotyp sowie der p21^{CIP1}-Überexpression und der Chemosensitivität der Zellen gegenüber 5-FU und CPT-11 zu erkennen.

5.2 Untersuchung des Einflusses einer p53-Mutation auf die Chemosensitivität der Kolonkarzinomzellen

Da über 60% der sporadischen Kolonkarzinome im p53-Gen mutiert sind, ist der Einfluss eines p53-Defektes auf die Chemosensitivität der Zellen von großem Interesse. In dieser Arbeit sollte der Einfluss einer Mutation im p53-Gen auf die Sensitivität von Zellen gegenüber 5-FU, CPT-11 und UCN-01 untersucht werden. Eine andere wichtige Determinante der Sensitivität gegenüber bestimmten Chemotherapeutika ist der Status des *mismatch repair* (MMR-) Systems, der nachfolgend ebenfalls untersucht wurde. Um den Einfluss einer p53-Mutation beurteilen zu können, wurden die Gruppen der MMR⁺- und der MMR⁻-Zelllinien getrennt untersucht und dargestellt. Es wurden Resultate von R. Magrini (aus derselben Arbeitsgruppe) an isogenen Zelllinien (HCT116 und HCT116+ch3) miteinbezogen, die sich nur in ihrem MMR-Status unterscheiden.

Sensitivität gegenüber 5-FU

In der MMR⁺-Zellgruppe waren nach Behandlung mit 5-FU die p53^{mut}-Zellen (SW480, HT 29) resistenter als die p53^{wt}-Zelllinien (HCT116+ch3, CSC-1, NCM460) (**Abb. 9**). HCT116+ch3 war die sensitivste Zelllinie. Somit war in der MMR⁺-Zellgruppe ein Unterschied in der Sensitivität zwischen den p53^{wt}- und den p53^{mut}-Zelllinien gegenüber 5-FU zu beobachten.

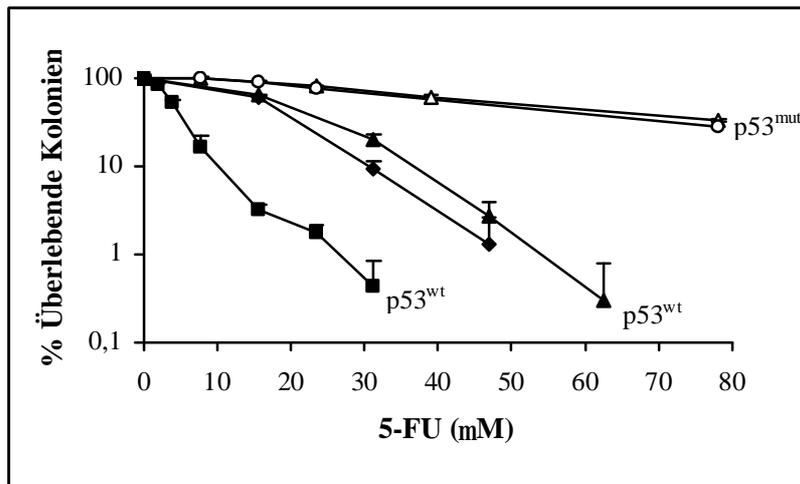


Abb. 9: In der MMR⁺-Zellgruppe waren nach Behandlung mit 5-FU die p53^{mut}-Zellen (SW480 (Δ), HT 29 (○)) resistenter als die p53^{wt}-Zellen (HCT116+ch3 (■), CSC-1 (▲), NCM460 (◆)), bestimmt im klonogenen Test. Die Abbildung zeigt ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen.

In der MMR⁻-Zellgruppe war nach Behandlung mit 5-FU kein Zusammenhang zwischen den Überlebensraten der p53^{wt}-Zelllinien (LoVo, LS 174T, HCT116 und 5583-S) und der p53^{mut}-Zelllinie DLD1 zu erkennen (**Abb. 10**). Daher scheint in MMR⁻-Zellen eine p53-Mutation keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber 5-FU zu haben.

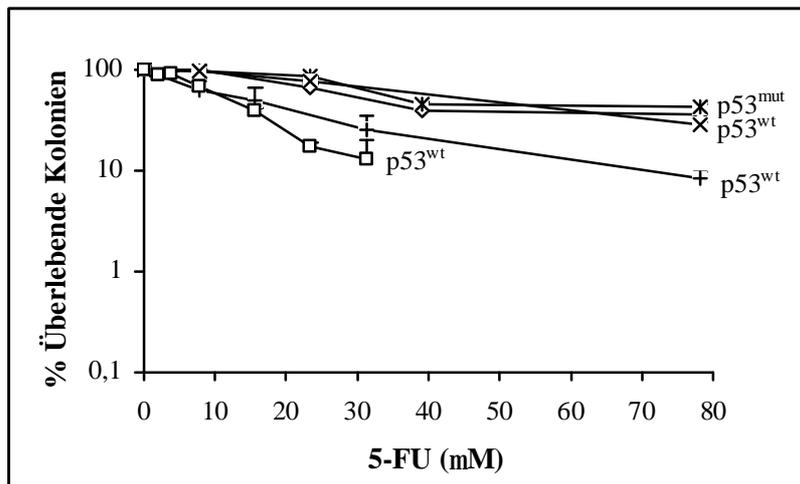


Abb. 10: In der MMR⁻-Zellgruppe zeigte sich nach Behandlung mit 5-FU im klonogenen Test kein Zusammenhang zwischen dem p53-Status und der Sensitivität gegenüber 5-FU (DLD1 (*), LoVo (◇), LS 174T (+), 5583-S (×), HCT116 (□)). Ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen.

Sensitivität gegenüber CPT-11

Unter den MMR⁺-Zelllinien waren die p53^{mut}-Zellen (SW480, HT 29) resistenter gegenüber CPT-11 als die p53^{wt}-Zelllinie (HCT116+ch3). Die von normaler Kolonmukosa stammenden Zelllinien NCM460 and CSC-1 waren jedoch nur geringfügig sensitiver als die p53^{mut}-Zelllinien (**Abb. 11**). Darüber hinaus war beim Vergleich der isogenen Zelllinien mit dem Genotyp p53^{-/-}, MMR⁺ und p53^{-/-}, MMR⁻ kein Unterschied in der Sensitivität zu beobachten (R. Magrini). So deuten sowohl die isogenen als auch die etablierten Zelllinien darauf hin, dass der p53-Genstatus für die Sensitivität gegenüber CPT-11, gemessen im klonogenen Test, keine Rolle spielt.

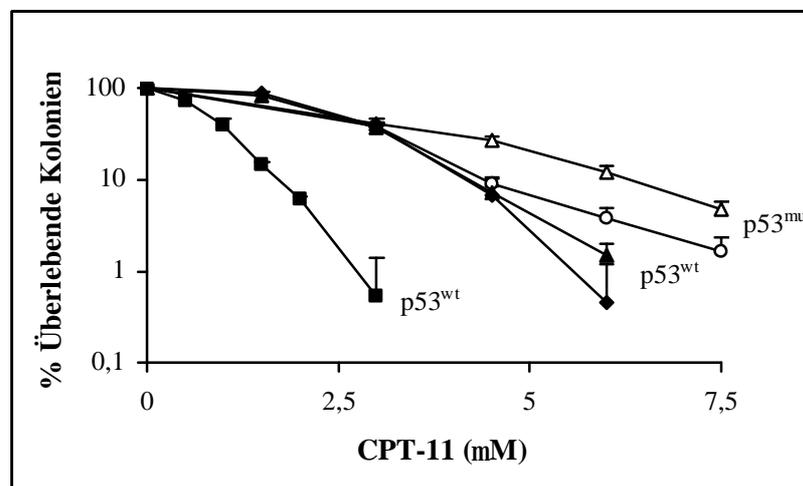


Abb. 11: Vergleichende Überlebensraten der MMR⁺-Zellen zeigten nach Behandlung mit CPT-11 im klonogenen Test nur einen geringfügigen Unterschied zwischen p53^{mut}-Zelllinien (SW480 (Δ), HT 29 (\circ)) und p53^{wt}-Zelllinien (CSC-1 (\blacktriangle), NCM460 (\blacklozenge)), während HCT116+ch3 (\blacksquare) besonders empfindlich waren. Ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen.

Die Überlebensraten in der MMR⁻-Zellgruppe zeigten nach Behandlung mit CPT-11 keinen Zusammenhang mit dem p53-Status, da es p53^{wt}-Zelllinien (LoVo, LS 174T und 5583-S) gab, die ähnlich auf die Behandlung reagierte wie die p53^{mut}-Zelllinie DLD1 und auch eine p53^{wt}-Zelllinie, die sensitiver war (HCT116) (**Abb. 12**). Somit hatte eine Mutation im p53-Gen in den MMR⁻-Zellen ebenfalls keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber dem Chemotherapeutikum.

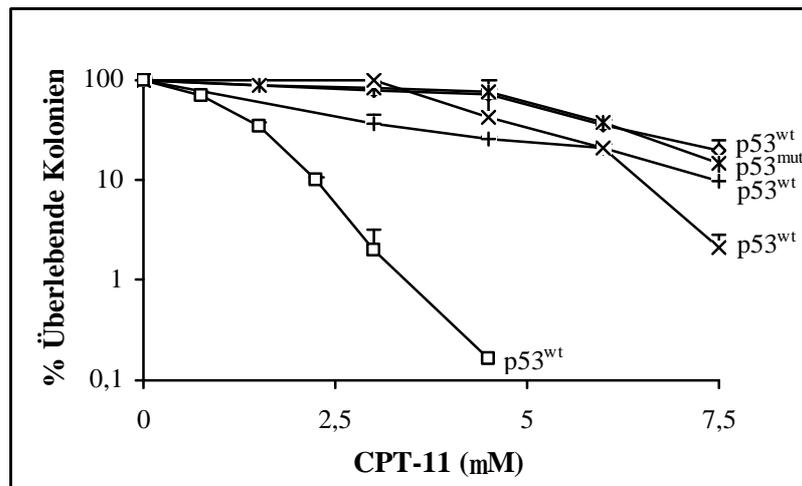


Abb. 12: Überlebensraten der MMR⁻-Zellen zeigten nach Behandlung mit CPT-11 im klonogenen Test keinen Zusammenhang zwischen p53^{mut}- (DLD1 (*)) und p53^{wt}- (LoVo (◇), LS 174T (+), 5583-S (×), HCT116 (□)) Zellen. Ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Es sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen dargestellt.

Sensitivität gegenüber UCN-01

Die $p53^{mut}$, MMR^+ -Zellen (SW480, HT 29) waren resistenter gegenüber UCN-01 als die $p53^{wt}$, MMR^+ -Zelllinie HCT116+ch3 (Abb. 13). Hier könnte die Mutation eine Rolle bei der Empfindlichkeit der Zellen spielen. Der Vergleich mit den isogenen Zelllinien (R. Magrini) bestätigte diese Hypothese, da HCT116 ($p53^{+/+}$) Zellen resistenter waren als HCT116 ($p53^{-/-}$) Zellen.

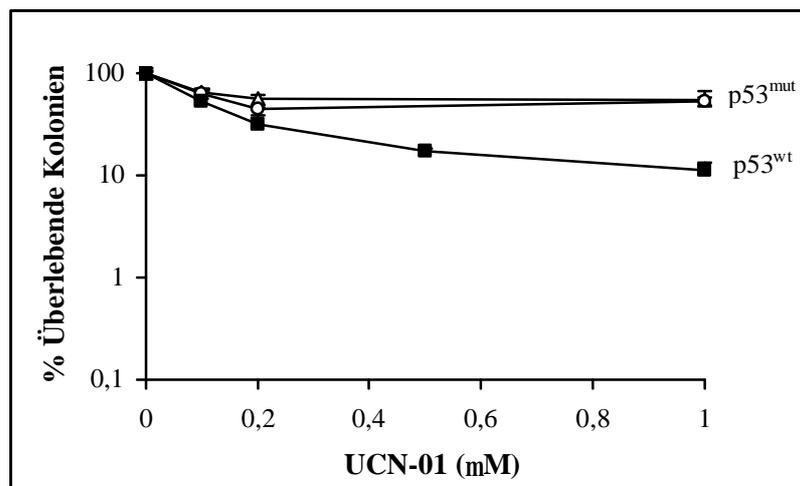


Abb. 13: $p53^{mut}$, MMR^+ -Zellen (SW480 (Δ), HT 29 (\circ)) waren gegenüber UCN-01 im klonogenen Test resistenter als die $p53^{wt}$, MMR^+ -Zelllinie HCT116+ch3 (\blacksquare). Es wird ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen.

In der MMR⁻-Zellgruppe verhielten sich die p53^{wt}-Zelllinien (LoVo, HCT116) ähnlich wie die p53^{mut}-Zelllinie (DLD1) (**Abb. 14**). Wie bereits für 5-FU und CPT-11 gezeigt, kommt somit einer Mutation im p53-Gen in MMR⁻-Zellen keine Bedeutung für die Empfindlichkeit gegenüber UCN-01 zu.

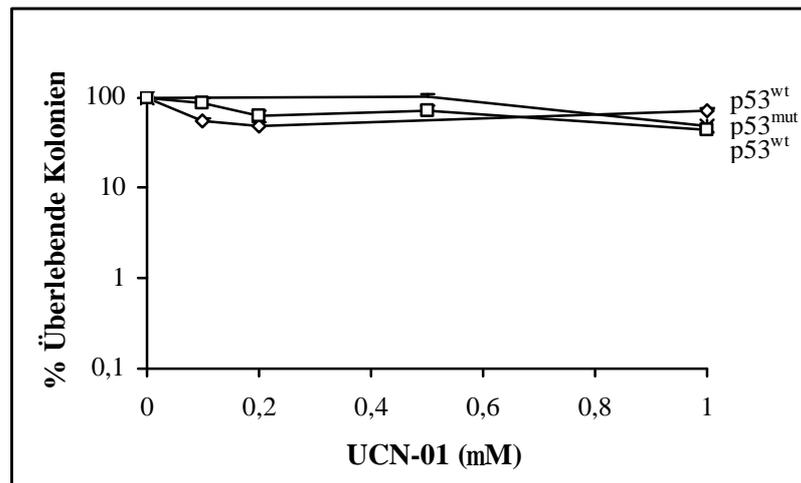


Abb. 14: Kein Unterschied in den Überlebensraten p53^{mut}, MMR⁻-Zellen (DLD1 (*)) und p53^{wt}, MMR⁻-Zellen (LoVo (◇), HCT116 (□)) gegenüber UCN-01 im klonogenen Test. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen.

Zusammenfassung:

1. In den untersuchten Zelllinien führte eine p53-Mutation zu einer erhöhten Resistenz der MMR⁺-Zellen gegenüber 5-FU (**Abb. 9**) und UCN-01 (**Abb. 13**). Eine p53-Mutation hatte keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber CPT-11 (**Abb. 11, 12**).
2. Wenn ein Defekt im *mismatch repair* System vorlag, war auch die Sensitivität gegenüber 5-FU und UCN-01 unabhängig vom p53-Status der Zellen (**Abb. 10, 14**).
3. Somit lassen die vorhandenen Daten die Hypothese zu, dass der Einfluss einer p53-Mutation auf die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber 5-FU beziehungsweise UCN-01 abhängig vom *mismatch repair* System ist. Diese Hypothese bedarf jedoch einer Überprüfung an einem großen Zellkollektiv sowie an isogenen Zellpaaren.

5.3 Untersuchung des Einflusses der Defekte im mismatch repair System

Untersucht werden sollte der Einfluss einer Mutation im hMLH1-Gen und somit eines Defektes im MMR-System auf die Sensitivität von Zellen gegenüber den verwendeten Chemotherapeutika. Um die alleinige Bedeutung der MMR-Defekte beurteilen zu können, wurden die Gruppen der p53^{wt}- und der p53^{mut}-Zelllinien ebenfalls getrennt untersucht und dargestellt. Die von R. Magrini an isogenen Zelllinien gewonnenen Ergebnisse wurden miteinbezogen.

Sensitivität gegenüber 5-FU

Bei der Behandlung mit 5-FU zeigte sich, dass in der p53^{wt}-Zellgruppe die MMR⁻-Zellen (LoVo, LS 174T und 5583-S) resistenter waren als die MMR⁺-Zellen (CSC-1 und NCM460) (Abb. 15).

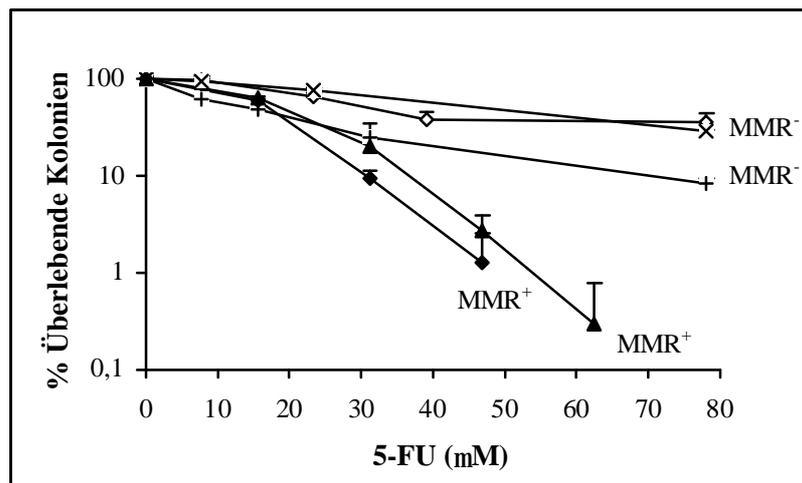


Abb. 15: Erhöhte Überlebensraten von p53^{wt}, MMR⁻-Zellen (LS 174T (+), 5583-S (x), LoVo (◇)) im Vergleich p53^{wt}, MMR⁺-Zellen (CSC-1 (▲), NCM460 (◆)) gegenüber 5-FU im klonogenen Test. Gezeigt wird ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Es sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen dargestellt.

Im isogenen Zellsystem war ebenfalls eine erhöhte Resistenz in den MMR⁻-Zellen (HCT116) gegenüber den MMR⁺-Zellen (HCT116+ch3) zu beobachten (Abb. 16). Das Ergebnis entspricht somit dem der untersuchten etablierten Zelllinien.

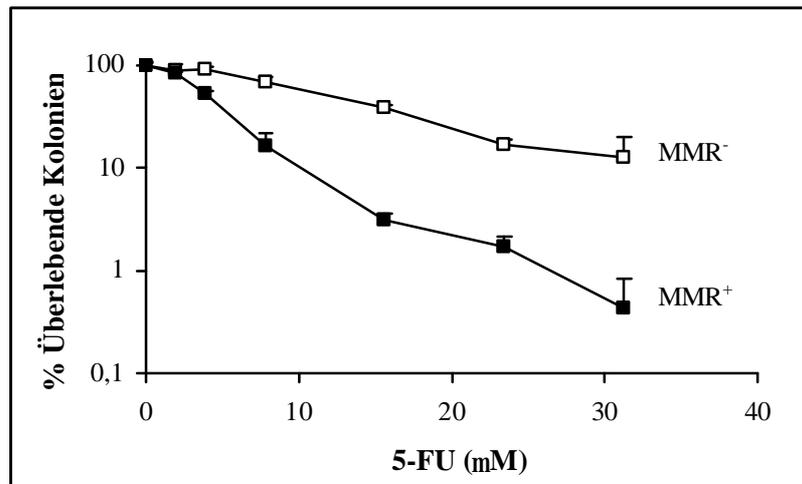


Abb. 16: Erhöhte Resistenz gegenüber 5-FU im klonogenen Test von p53^{wt}, MMR⁻-Zellen (HCT116 (□)) gegenüber p53^{wt}, MMR⁺-Zellen (HCT116+ch3 (■)). Es wird ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen.

In der Gruppe der p53^{mut}-Zelllinien war nach 5-FU-Behandlung kein Zusammenhang zwischen der Sensitivität und dem MMR-Status zu sehen, da die MMR⁺-Zelllinien (SW480 und HT 29) ähnliche Überlebensraten aufwiesen wie die MMR⁻-Zelllinie DLD1 (**Abb. 17**).

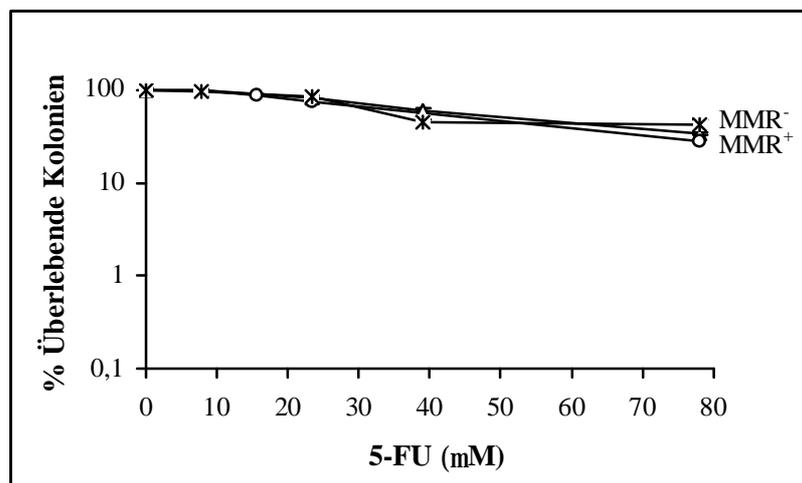


Abb. 17: Ähnliche Überlebensraten von p53^{mut}, MMR⁺-Zellen (SW480 (△), HT 29 (○)) und p53^{mut}, MMR⁻-Zellen (DLD1 (*)) im klonogenen Test nach 5-FU-Behandlung. Ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Dargestellt werden die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen.

Sensitivität gegenüber CPT-11

Bei Behandlung mit CPT-11 war kein Zusammenhang zwischen der Sensitivität der p53^{wt}-Zellen und dem MMR-Status zu sehen, da zwei der MMR⁻-Zelllinien (LoVo und 5583-S) resistenter waren als die MMR⁺-Zelllinien (HCT116+ch3, CSC-1 und NCM460) und eine MMR⁻-Zelllinie (HCT116) sensitiver war (**Abb. 18**).

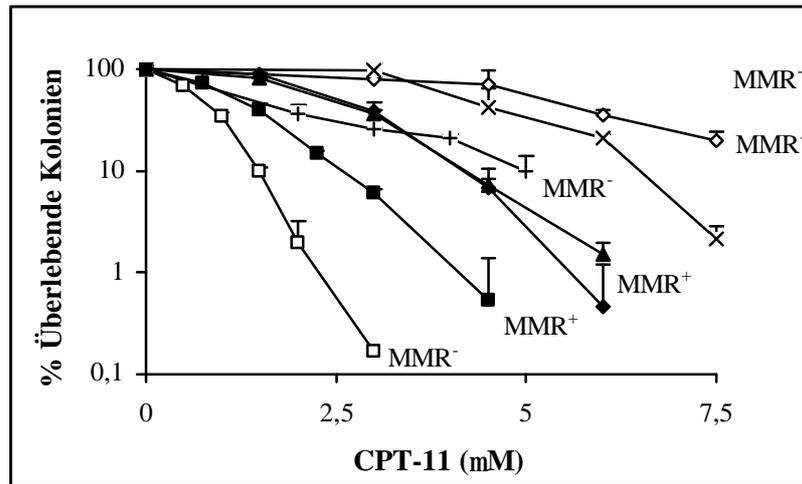


Abb. 18: Kein Zusammenhang zwischen den Überlebensraten von p53^{wt}, MMR⁻-Zellen (LoVo (◇), LS 174T (+), 5583-S (×), HCT116 (□)) und p53^{wt}, MMR⁺-Zellen (HCT116+ch3 (■), CSC-1 (▲), NCM460 (◆)) nach CPT-11-Behandlung im klonogenen Test. Die Kurven zeigen ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Es sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen dargestellt.

Die Sensitivität in der $p53^{mut}$ -Zellgruppe nach Behandlung mit CPT-11 zeigte keine Korrelation zwischen der Sensitivität und dem MMR-Status, da sich die Empfindlichkeit der MMR^+ -Zelllinien (SW480, HT 29) nur geringfügig von der MMR^- -Zelllinie DLD1 unterschied (Abb. 19).

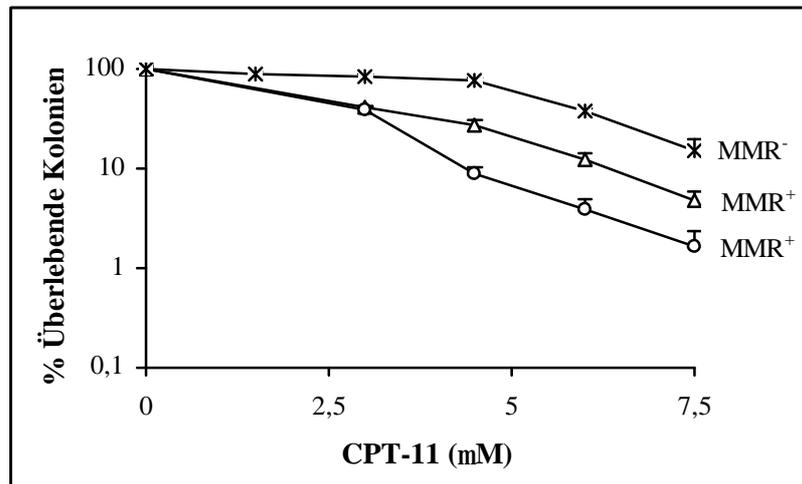


Abb. 19: Ähnliche Überlebensraten von $p53^{mut}$, MMR^+ -Zellen (SW480 (Δ), HT 29 (O)) und $p53^{mut}$, MMR^- -Zellen (DLD1 ($*$)) nach Behandlung mit CPT-11, bestimmt im klonogenen Test. Es wird ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen dargestellt. Die Werte entsprechen den Mittelwerten von drei Messwerten mit Standardabweichungen.

Sensitivität gegenüber UCN-01

Nach Behandlung mit UCN-01 wurde beobachtet, dass in der p53^{wt}-Zellgruppe, die MMR⁻-Zellen (LoVo und HCT116) resistenter waren als die MMR⁺-Zellen (HCT116+ch3) (**Abb. 20**), so dass hier dem MMR-Defekt eine Bedeutung bei der Reaktion der Zellen auf das Chemotherapeutikum zukommen könnte.

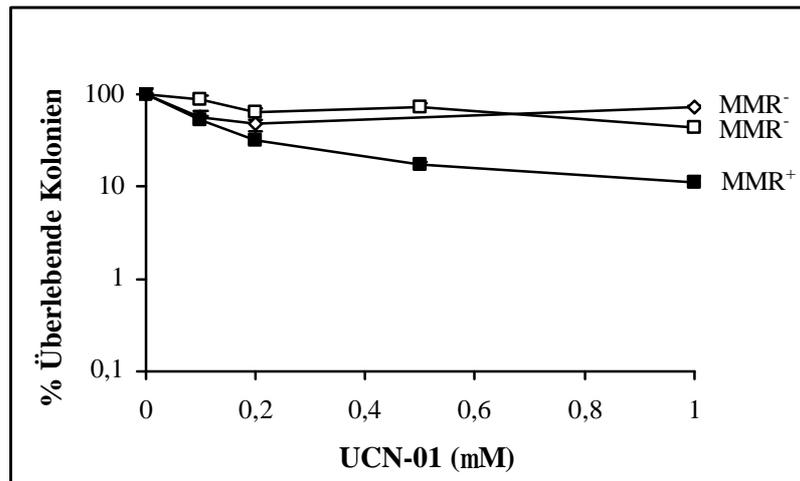


Abb. 20: Erhöhte Resistenz der p53^{wt}, MMR⁻-Zellen (LoVo (◇), HCT116 (□)) gegenüber den p53^{wt}, MMR⁺-Zellen (HCT116+ch3 (■)) nach UCN-01-Behandlung, bestimmt im klonogenen Test. Die Kurven zeigen ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen.

In der $p53^{mut}$ -Zellgruppe war nach Behandlung mit UCN-01 kein Zusammenhang zwischen der Sensitivität und dem MMR-Status zu erkennen, da die MMR^+ -Zelllinien (HT 29 und SW480) eine ähnliche Sensitivität aufwiesen wie die MMR^- -Zelllinie (DLD1) (**Abb. 21**).

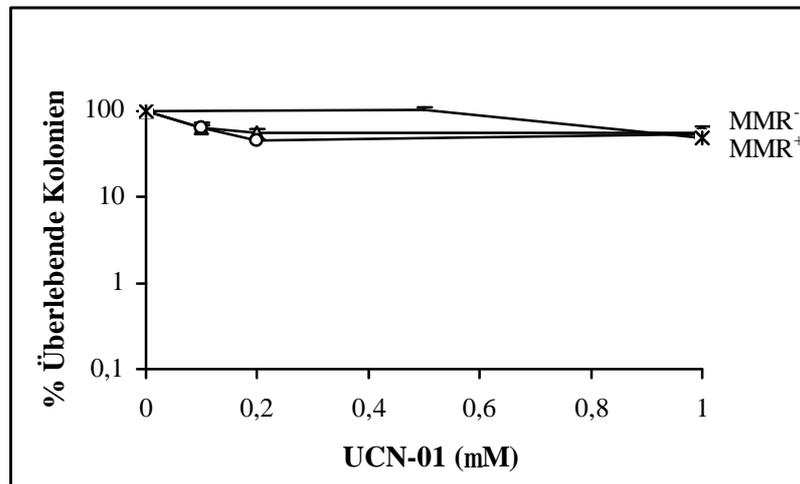


Abb. 21: Kein Unterschied in der Sensitivität gegenüber UCN-01 zwischen $p53^{mut}$, MMR^+ -Zellen (SW480 (Δ), HT 29 (\circ)) und $p53^{mut}$, MMR^- -Zellen (DLD1 ($*$)) im klonogenen Test. Es wird ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen.

Zusammenfassung:

1. Wenn eine Mutation im p53-Gen vorlag, war die Sensitivität gegenüber den untersuchten Chemotherapeutika vom Status des *mismatch repair* Systems unabhängig (**Abb. 17, 19, 21**).
2. Ein Defekt im MMR-System erhöhte die Resistenz gegenüber 5-FU und UCN-01, wenn p53^{wt} vorlag (**Abb. 15, 20**).
3. Bei Behandlung mit CPT-11 beeinflusste weder ein Defekt im *mismatch repair* System noch eine p53-Mutation die Sensitivität der untersuchten Zelllinien (**Abb. 18, 19**).
4. Somit war der Einfluss eines Defektes im MMR-System auf die Chemosensitivität der Zellen abhängig vom p53-Status der Zellen und von der verwendeten Substanz.

In **Tabelle 6** sind die Ergebnisse des Einflusses einer p53-Mutation und eines Defektes im MMR-System auf die Sensitivität der Zelllinien zusammengefasst. Die Empfindlichkeit gegenüber 5-FU und UCN-01 wurde folglich sowohl vom MMR-Status als auch vom p53-Status beeinflusst. Der Status des einen Gens scheint den Effekt der Mutation des anderen Gens auf die Chemosensitivität zu beeinflussen.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse

Chemotherapeutikum	Einfluss einer p53-Mutation		Einfluss eines MMR-Defektes	
	in MMR ⁺	in MMR ⁻	in p53 ^{wt}	in p53 ^{mut}
5-FU	erhöhte Resistenz	keine Auswirkung	erhöhte Resistenz	keine Auswirkung
CPT-11	keine Auswirkung	keine Auswirkung	keine Auswirkung	keine Auswirkung
UCN-01	erhöhte Resistenz	keine Auswirkung	erhöhte Resistenz	keine Auswirkung

5.4 Untersuchung des Mechanismus der Zytotoxizität von 5-FU

5.4.1 Bestimmung der Apoptose nach Behandlung mit 5-FU

Durch Nachweis der Spaltung von Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase (PARP) im Western Blot sollte überprüft werden, ob es einen Unterschied im Ausmaß der Apoptose von MMR⁻- und MMR⁺-Zellen nach der Behandlung mit 5-FU gibt, der den im klonogenen Test sichtbaren Unterschied in der Überlebensrate der Zellen erklären könnte.

Im klonogenen Test wurde im isogenen Zellsystem eine erhöhte Resistenz in den MMR⁻-Zellen gegenüber den MMR⁺-Zellen nach Behandlung mit 5-FU gefunden (**Abb. 16**). Bei der Behandlung mit 5-FU (31,25 µM) lag der Prozentsatz überlebender Kolonien bei 12% in HCT116 und bei 0,4% in HCT116+ch3 Zellen. Die ebenfalls erhöhte Resistenz in den etablierten Zellen bestätigte den Befund (**Abb. 15**).

Im Western Blot war nur ein geringfügiger Unterschied in der PARP-Spaltung in HCT116 und HCT116+ch3 Zellen zu sehen. In HCT116 Zellen betrug die Spaltung nach 48 Stunden Behandlung mit 5-FU (31,25 µM) 31% und 24 Stunden später 30%. In HCT116+ch3 Zellen waren es nach 48 Stunden Behandlung mit 5-FU 37% und 24 Stunden später 22% (**Abb. 22**). Daraus folgt, dass der Unterschied in der Chemosensitivität gegenüber 5-FU wahrscheinlich nicht durch eine unterschiedliche Apoptoserate der Zellen zu begründen ist. Der geringere Prozentsatz der Spaltung nach 72 Stunden erklärt sich daraus, dass nach der Behandlung mit 5-FU über 48 Stunden das Medium mitsamt den nicht adhärennten Zellen entfernt worden ist und folglich 24 Stunden später nur noch die nach dem Wechsel des Mediums apoptotisch gewordenen Zellen nachgewiesen werden konnten.

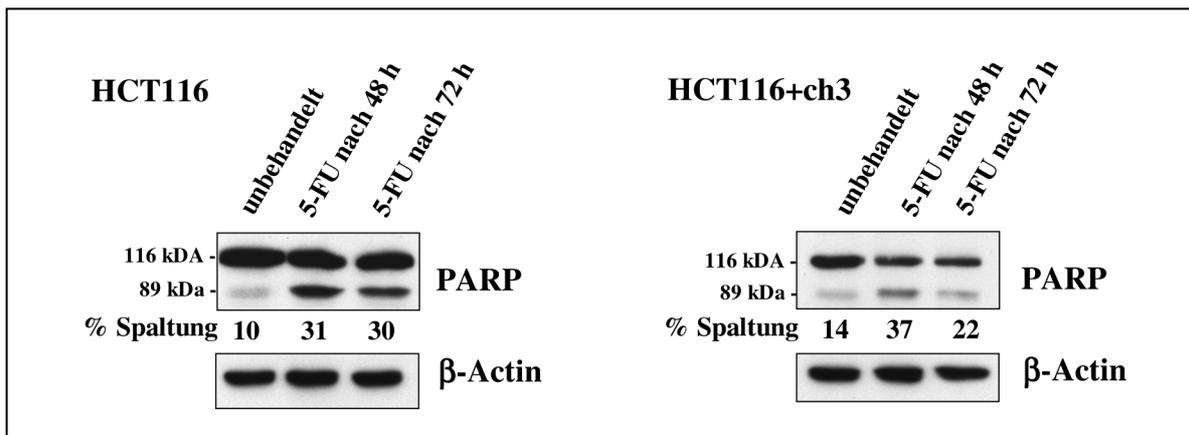


Abb 22.: Geringfügiger Unterschied in der Spaltung von PARP in HCT116 und HCT116+ch3 Zellen im Western Blot nach Behandlung mit 5-FU (31,25 μ M) für 48 h. Die respektiven Prozentsätze der überlebenden Kolonien im klonogenen Test bei 31,25 μ M 5-FU waren 12% in HCT116 und 0,4% in HCT116+ch3 Zellen (**Abb. 16**). Die Bestimmung erfolgte 48 und 72 Stunden nach Behandlungsbeginn. β -Actin dient dem Vergleich der aufgetragenen Proteinmengen.

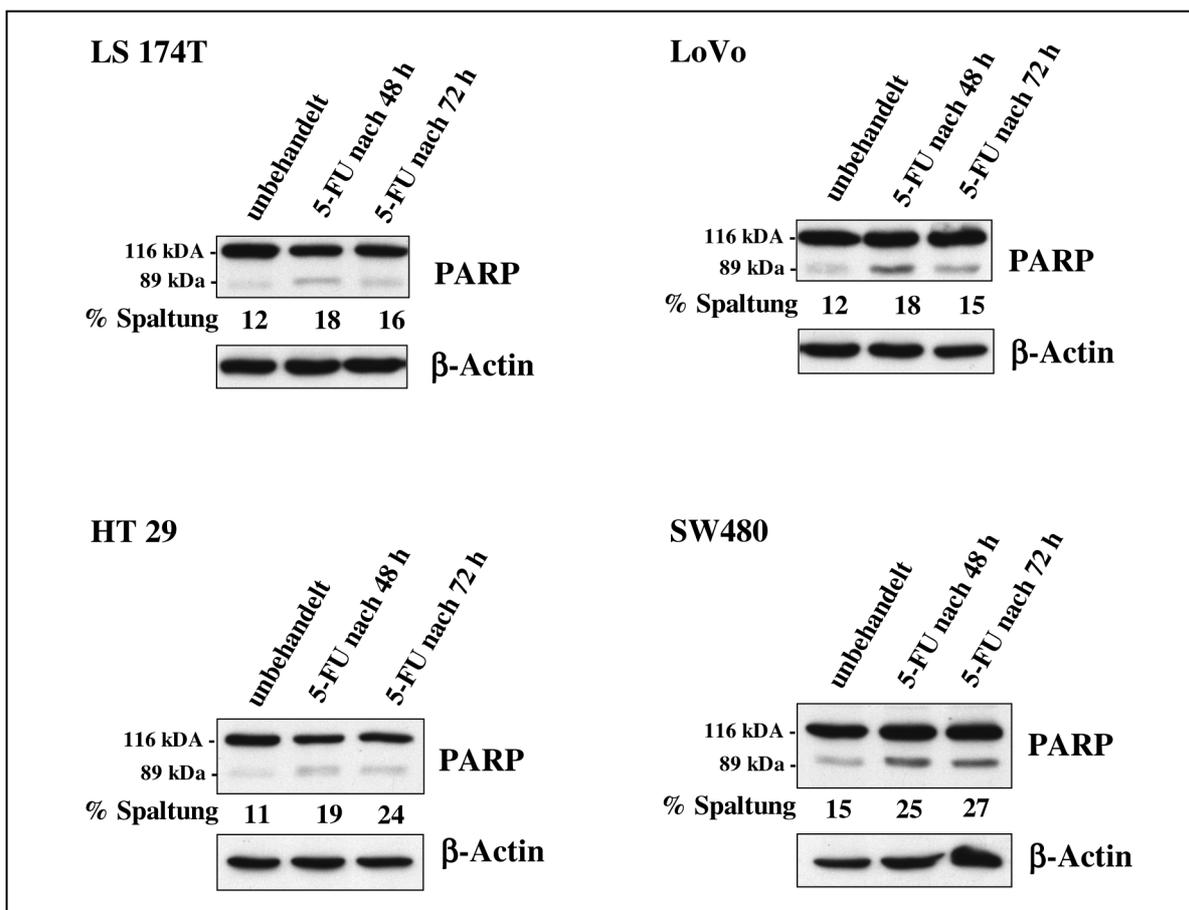


Abb 23.: Spaltung von PARP in LS 174T, LoVo, HT 29 und SW480 Zellen im Western Blot unterscheidet sich kaum. Die respektiven Prozentsätze der überlebenden Kolonien im klonogenen Test bei 31,25 μ M 5-FU waren 25% in LS 174T, 66% in LoVo (**Abb. 15**), 74% in HT 29 und 73% in SW480 Zellen (**Abb. 17**). Die Bestimmung erfolgte 48 und 72 Stunden nach Beginn der 48-stündigen Behandlung mit 5-FU (31,25 μ M). β -Actin dient dem Vergleich der aufgetragenen Proteinmengen.

Im Western Blot betrug die Spaltung von PARP in den Zelllinien LS 174T und LoVo 18% nach 48 Stunden Behandlung mit 5-FU sowie 15% und 16% 72 Stunden nach Behandlungsbeginn (**Abb. 23**). In HT 29 Zellen betrug die Spaltung 19% und 24%, in SW480 25% und 27% nach 48 beziehungsweise 72 Stunden (**Abb. 23**).

Im MTT-Test, der 48 Stunden nach Beginn der Behandlung erfolgte, war der Prozentsatz überlebender Zellen bei der Behandlung mit 5-FU (31,25 μ M) 64% für LS 174T und 53% für LoVo, während die Werte bei 40% für HT 29 und bei 36% für SW480 lagen (**Abb. 1**). Ein Unterschied in der Apoptoserate erklärt somit nicht den Unterschied in der Reaktion der Zellen auf die 5-FU-Behandlung im MTT-Test.

Im klonogenen Test betrug die Überlebensraten nach einer Behandlung mit 5-FU (31,25 μ M) etwa 66% für LoVo, 25% für LS 174T (**Abb. 15**), 74% für HT 29 sowie 73% für SW480 (**Abb. 17**). Die Überlebensraten der vier im Western Blot untersuchten etablierten Zelllinien (LoVo, LS 174T, HT 29 und SW480) waren somit im klonogenen Test ähnlich, mit Ausnahme von LS 174T Zellen, die besonders sensitiv reagierten. Demzufolge entspricht eine ähnliche Apoptoserate der Zellen im Western Blot den im klonogenen Test gezeigten Ergebnissen. Die etablierten Zelllinien zeigten im klonogenen Test eine ähnlich hohe Resistenz und eine geringe Spaltung von PARP (18%, 19% und 25% nach 48 Stunden). Die HCT116 Zelllinien zeigten eine niedrigere Überlebensrate und eine höhere Spaltung von PARP (31% und 37% nach 48 Stunden). Somit korrelieren die Ergebnisse der PARP-Analyse mit den Ergebnissen des klonogenen Tests, jedoch nicht mit denen des MTT-Tests. In **Tabelle 7** sind die Ergebnisse des MTT- sowie des klonogenen Tests und der PARP-Analyse zusammengefasst.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse aus MTT- und klonogenem Test sowie der PARP-Spaltung im Western Blot.

Zelllinie	MTT-Test	Klonogener Test	PARP-Spaltung 48h / 72h
LS 174T	64%	25%	18 / 16%
LoVo	53%	66%	18 / 15%
HT 29	40%	74%	19 / 24%
SW480	36%	73%	25 / 27%
HCT116	nicht untersucht	12%	31 / 30%
HCT116+ch3	nicht untersucht	0,4%	37 / 22%

5.4.2 Bestimmung der Seneszenz nach Behandlung mit 5-FU

Außer mit Apoptose oder Nekrose können die Zellen mit einem dauerhaften Zellarrest, der häufig zur Zellseneszenz führt, auf die Behandlung mit Chemotherapeutika reagieren. Die dauerhaft arretierten Zellen bilden kleine Kolonien und können im klonogenen Test von toten Zellen nicht unterschieden werden. Es wurde daher untersucht, inwiefern 5-FU-Behandlung die Seneszenz der Zellen erhöht. Als Maß der Seneszenz wird die Aktivität des Enzyms SA- β -Gal (*senescence-associated β -galactosidase*) mit 5-Bromo-4-chloro-3-indol- β -D-Galactopyranosid (X-Gal) als Substrat nachgewiesen.

In den p53^{wt}-Zelllinien (LS 174T, LoVo, HCT116 und HCT116+ch3) wurde im Gegensatz zu den p53^{mut}-Zelllinien (HT 29 und SW480) ein Nachweis von Seneszenz erwartet.

Nach Behandlung mit 5-FU zeigten sich nur kleine Kolonien oder einzelne Zellen, während in der Kontrolle Koloniebildung sichtbar wurde. Es fanden sich jedoch weder eine SA- β -Gal-Färbung noch eine Morphologie der Zellen, die auf Seneszenz hinweisen würde (**Abb. 24, 25**). Somit induzierte 5-FU im Gegensatz zu CPT-11 (R. Magrini) keine Seneszenz, und die erhöhte Sensitivität von Zellen im klonogenen Test kann nicht durch Seneszenzauslösung erklärt werden.

Die Zelllinie LS 174T zeigte jedoch eine Färbung, die nach der Behandlung intensiver war (**Abb. 24**). Eine Seneszenzauslösung in dieser Zelllinie könnte ihre hohe Sensitivität erklären. Diese Hypothese müsste mit anderen Methoden überprüft werden.

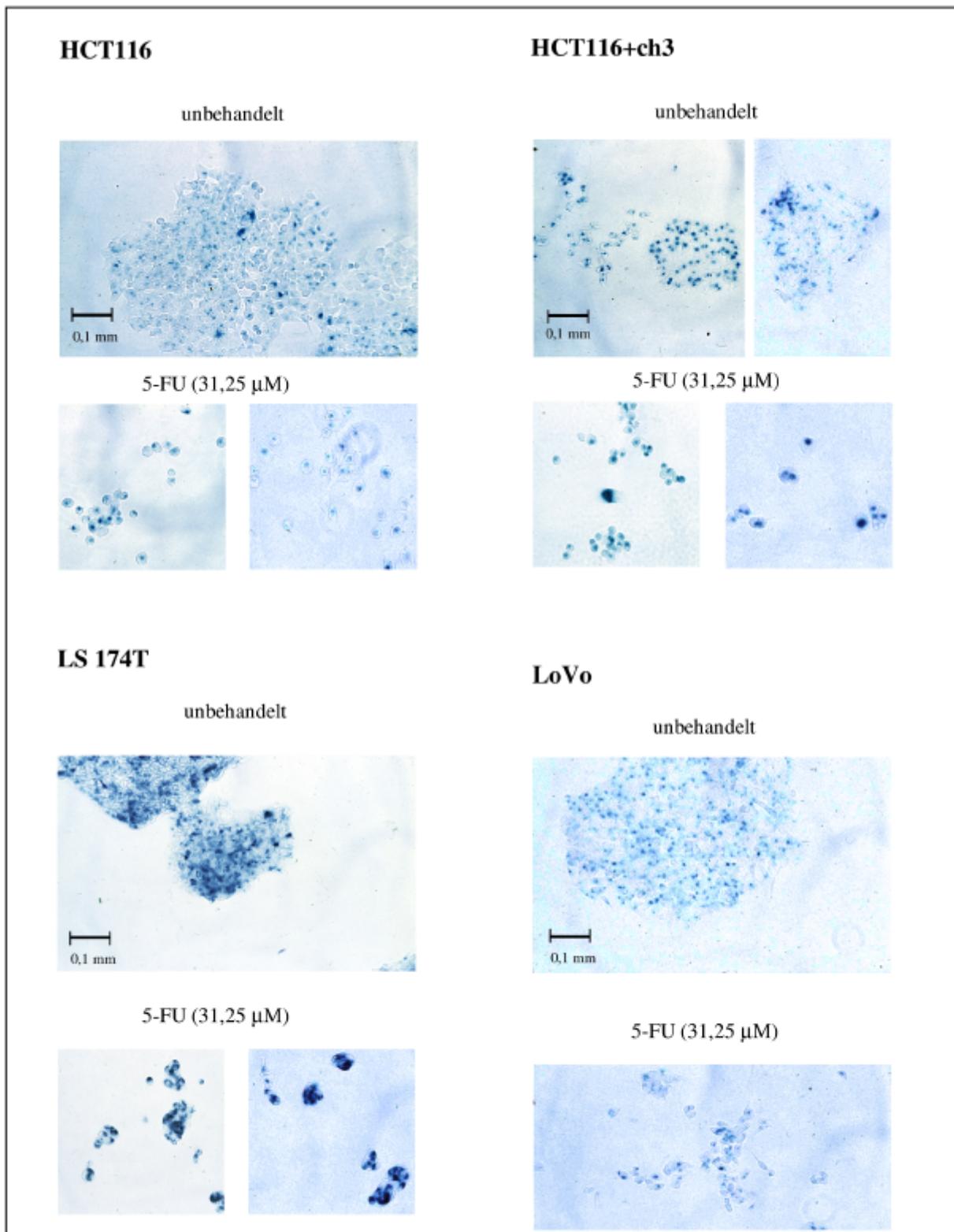


Abb. 24: Kein Nachweis von Seneszenz durch SA-β-Gal-Färbung nach Behandlung mit 5-FU in den p53^{wc}-Zelllinien HCT116, HCT116+ch3 und LoVo. LS 174T Zellen zeigten nach der Behandlung mit 5-FU eine verstärkte Intensität der Färbung, die durch Seneszenz erklärt werden könnte.

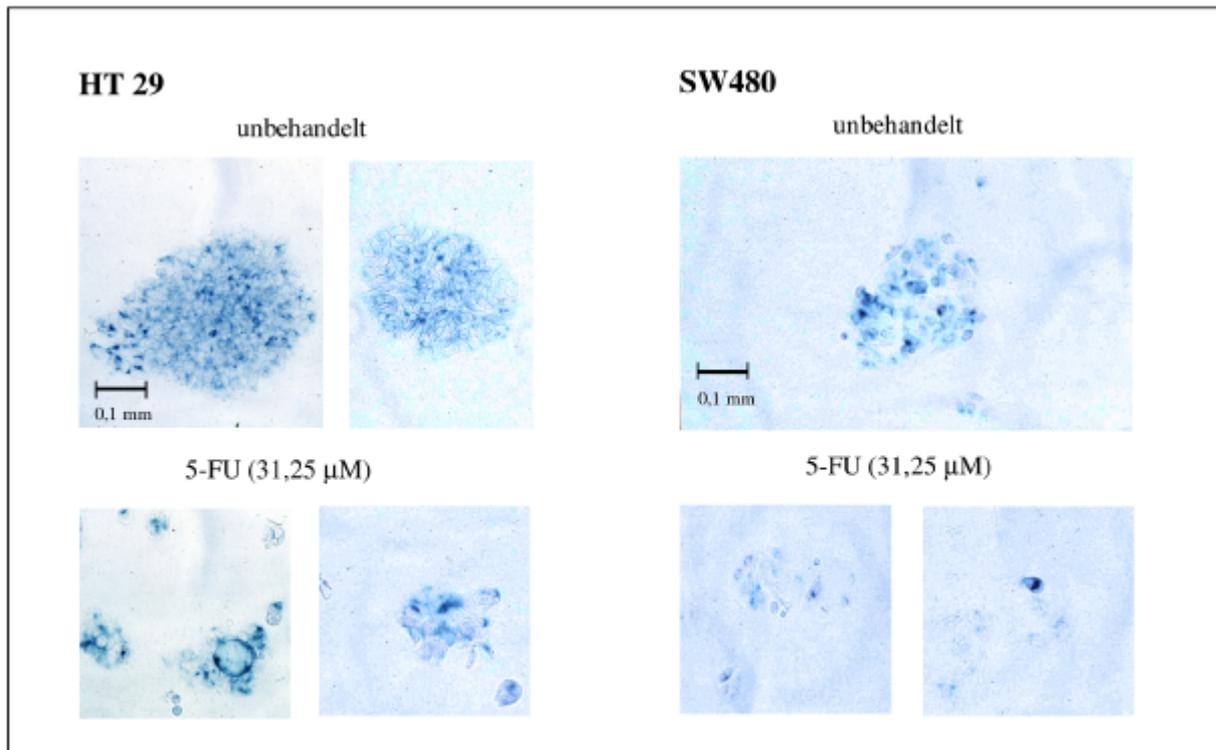


Abb. 25: Kein Nachweis von Seneszenz durch SA-β-Gal-Färbung in p53^{mut}-Zelllinien HT 29 und SW480 nach Behandlung mit 5-FU.

5.5 Untersuchung des Einflusses der Läsionen in p53 und im MMR-System auf die modulatorische Wirkung von 7-Hydroxystaurosporin (UCN-01)

5.5.1 Kombination von 5-FU und UCN-01

Bei Anwendung geringer Konzentrationen von UCN-01 wird bei bestimmten Zelllinien eine Verstärkung der Wirkung anderer Zytostatika beobachtet. Diese Wirkungsverstärkung wird vor allem für Zellen mit einer Mutation im p53-Gen beschrieben. In diesen Zellen entfällt der für eine Reparatur notwendige G1-Kontrollpunkt, und sie gehen daher direkt in die G2-Phase des Zellzyklus über. Es wird angenommen, dass die modulatorische Wirkung von UCN-01 auf einer Aufhebung des G2-Kontrollpunktes beruht. Die Anwendung von UCN-01 in niedrigen, nicht zytotoxischen Konzentrationen scheint daher zur Kombination mit anderen Chemotherapeutika geeignet und sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden. Für die Untersuchung des Einflusses von UCN-01 auf die Zytotoxizität von 5-FU und CPT-11 wurden klonogene Tests durchgeführt. In **Tabelle 8** sind die verwendeten Zelllinien aufgeführt. Es wurden nur MMR⁺-Zelllinien verwendet, damit eine Läsion des MMR-Systems das Ergebnis nicht zusätzlich beeinflusst und der Einfluss von p53 gezeigt werden kann.

Tabelle 8: Für die kombinierte Behandlung von 5-FU und UCN-01 beziehungsweise CPT-11 und UCN-01 verwendete Zelllinien

Zelllinie	Status des p53-Gens	Status des <i>mismatch repair</i> Systems
HT 29	p53 ^{mut}	MMR ⁺
SW480	p53 ^{mut}	MMR ⁺
HCT116+ch3	p53 ^{wt}	MMR ⁺
CSC-1	p53 ^{wt} *	MMR ⁺ *
NCM460	p53 ^{wt} *	MMR ⁺ *

*Die Zelllinien CSC-1 und NCM460 wurden aus normalem Kolongewebe gezüchtet und werden deshalb als p53^{wt}, MMR⁺ klassifiziert. Ihr Status wurde jedoch nicht überprüft.

Protokoll der Zugabe der Chemotherapeutika:

24 Stunden nach Aussaat wurden die Zellen für 48 Stunden mit 5-FU und UCN-01 oder CPT-11 und UCN-01 behandelt.

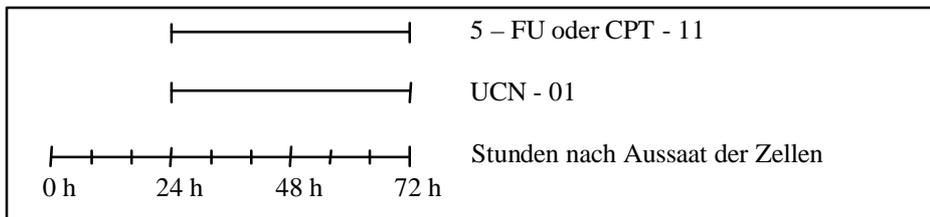


Abb. 26: Behandlungsschema der Zellen in den Experimenten, die in den **Abb. 27-34** und **Abb. 37-38** dargestellt sind.

Die Kombination von 5-FU mit 0,1 μ M oder 0,2 μ M UCN-01 verstärkte die Zytotoxizität von 5-FU gegenüber HT 29 Zellen (**Abb. 27**).

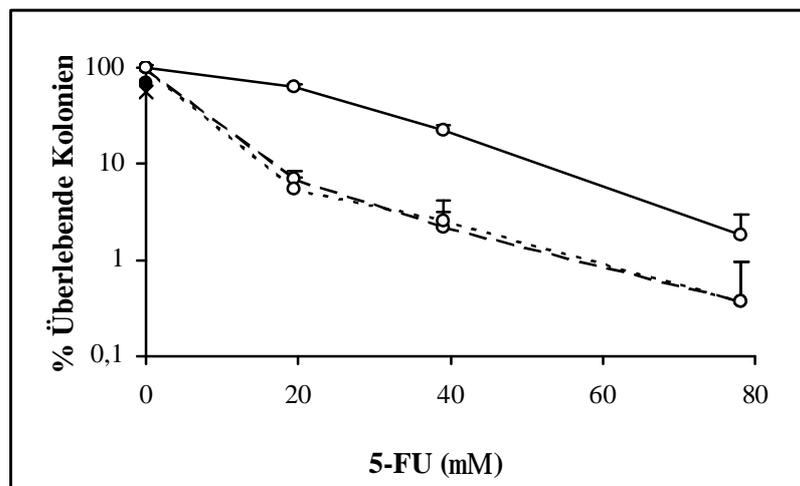


Abb. 27: Wirkungsverstärkung von 5-FU auf HT 29 Zellen durch kombinierte Behandlung mit UCN-01 in unterschiedlichen Konzentrationen. 5-FU (—○—), 5-FU mit 0,1 μ M UCN-01 (---○---), 5-FU mit 0,2 μ M UCN-01 (···○···). Die Behandlung mit 0,1 μ M UCN-01 (●) und 0,2 μ M UCN-01 (x) zeigte nur eine geringfügig zytotoxische Wirkung. Die Kurven zeigen ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen.

Bei einer Behandlung mit 5-FU (19,5 μM) überlebten 64,4% der Zellen, mit UCN-01 (0,1 μM) 69,4% und mit UCN-01 (0,2 μM) waren es 56,8%. Durch die kombinierte Behandlung mit 5-FU (19,5 μM) und UCN-01 (0,1 μM) überlebten nur noch 6,9% und mit 5-FU (19,5 μM) und UCN-01 (0,2 μM) waren es 5,5% überlebende Kolonien. Somit handelte es sich um eine synergistische Wirkung beider Therapeutika und nicht um eine Addition der Einzelwirkungen. Durch die Erhöhung der UCN-01 Konzentration fand keine Steigerung der Wirkung statt.

In SW480 Zellen zeigte die Kombination von 5-FU mit 0,1 μM oder 0,2 μM UCN-01 ebenfalls eine Verstärkung der Zytotoxizität von 5-FU (**Abb. 28**). Dieser Effekt war bei SW480 Zellen weniger ausgeprägt als bei HT 29 Zellen. Die höhere Konzentration von UCN-01 führte nur zu einer geringfügigen Steigerung der Wirkung.

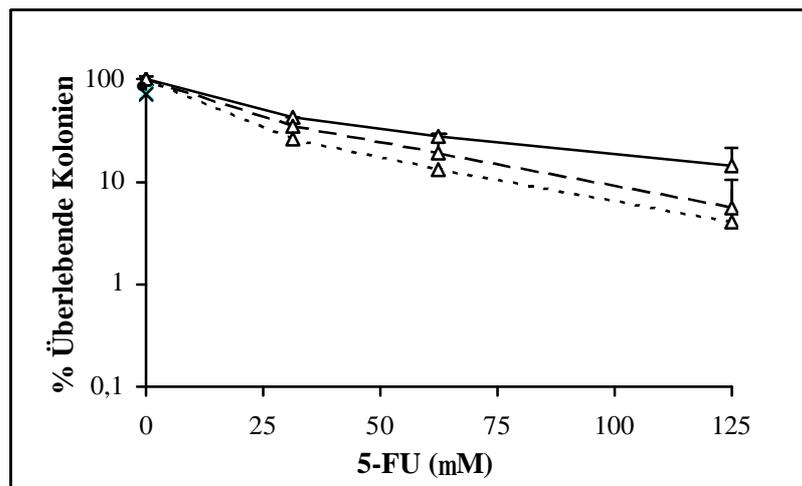


Abb. 28: Wirkungsverstärkung durch kombinierte Behandlung mit UCN-01 in SW480 Zellen. 5-FU (— Δ —), 5-FU mit 0,1 μM UCN-01 (— Δ —), 5-FU mit 0,2 μM UCN-01 (· · · Δ · · ·). Die Behandlung mit 0,1 μM UCN-01 (\bullet) und 0,2 μM UCN-01 (\times) zeigte nur eine geringfügig zytotoxische Wirkung. Die Kurven zeigen ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen.

In HCT116+ch3 Zellen war durch die Kombination von 5-FU mit 0,1 μM oder 0,2 μM UCN-01 eine geringfügig protektive Wirkung zu beobachten, die mit steigender Konzentration von UCN-01 zunahm (**Abb. 29**).

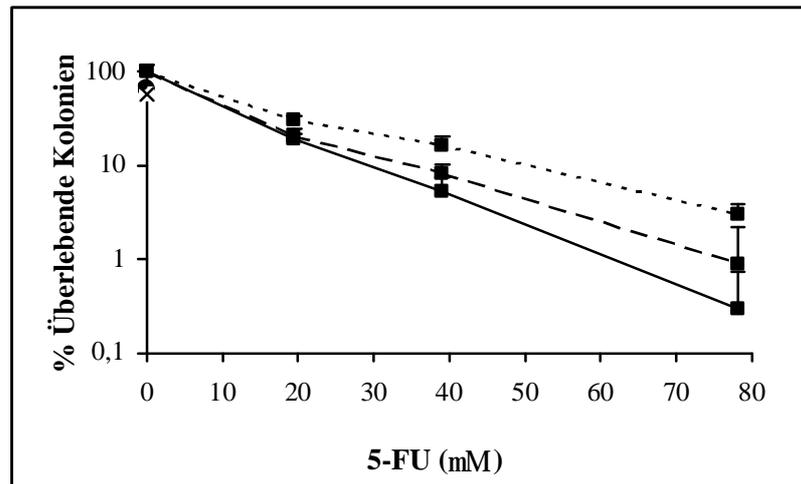


Abb. 29: Protektiver Effekt durch kombinierte Behandlung von HCT116+ch3 Zellen mit 5-FU und UCN-01. 5-FU (—■—), 5-FU mit 0,1 μM UCN-01 (—■—), 5-FU mit 0,2 μM UCN-01 (···■···). Geringfügig zytotoxische Wirkung nach Behandlung mit 0,1 μM UCN-01 (●) und 0,2 μM UCN-01 (x). Ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen.

In CSC-1 und NCM460 Zellen führten 0,1 μM oder 0,2 μM UCN-01 zu einer Wirkungsverstärkung von 5-FU (**Abb. 30**, **Abb. 31**). Diese war unabhängig von der UCN-01-Konzentration. Allerdings wurde im Vergleich zu den Tumorzelllinien eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der Behandlung mit UCN-01 beobachtet: Bei Zugabe von 0,1 μM UCN-01 überlebten nur 44,4% und bei 0,2 μM UCN-01 nur 42,9% der CSC-1 Zellen. In NCM460 waren es bei 0,1 μM UCN-01 45,6% und bei 0,2 μM UCN-01 37,6% überlebende Kolonien. Somit könnte es sich hier um einen additiven Effekt der Zytotoxizität der beiden Chemotherapeutika handeln.

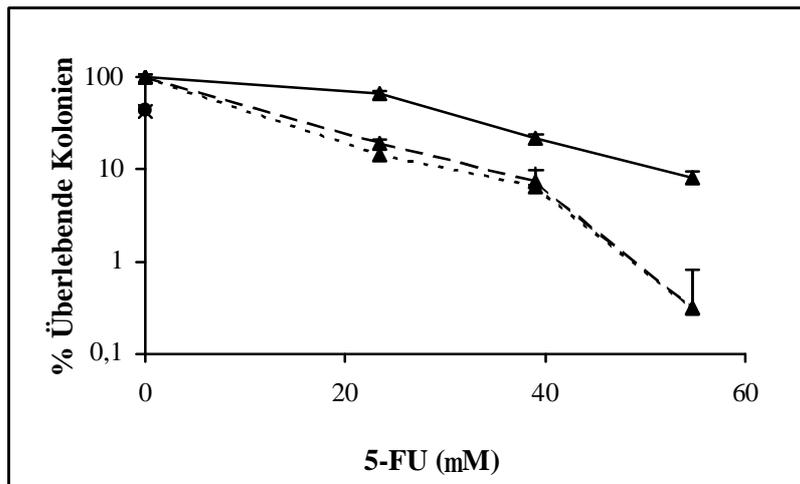


Abb. 30: Kombinierte Behandlung von CSC-1 Zellen mit 5-FU und UCN-01 in unterschiedlichen Konzentrationen. 5-FU (—▲—), 5-FU mit 0,1 μM UCN-01 (---▲---), 5-FU mit 0,2 μM UCN-01 (···▲···). Nach Behandlung mit 0,1 μM UCN-01 (●) und 0,2 μM UCN-01 (x) war bereits eine zytotoxische Wirkung zu beobachten. Die Kurven zeigen ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Es sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen dargestellt.

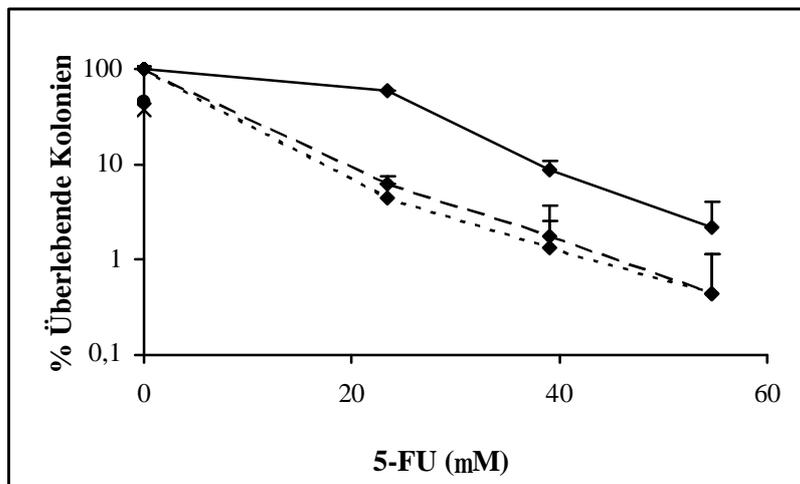


Abb. 31: Kombinierte Behandlung von NCM460 Zellen mit 5-FU und UCN-01. 5-FU (—◆—), 5-FU mit 0,1 μM UCN-01 (---◆---), 5-FU mit 0,2 μM UCN-01 (···◆···). Eine zytotoxische Wirkung war bereits nach Behandlung mit 0,1 μM UCN-01 (●) und 0,2 μM UCN-01 (x) zu beobachten. Die Kurven zeigen ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen.

5.5.2 Kombination von CPT-11 und UCN-01

Bei der Kombination von CPT-11 mit 0,1 μM oder 0,2 μM UCN-01 wurde in HT 29 Zellen eine Erhöhung der Zytotoxizität von CPT-11 beobachtet (**Abb. 32**). Dieser Effekt war von den verwendeten UCN-01-Konzentrationen unabhängig. Die Überlebensraten lagen nach der Behandlung mit CPT-11 (1,5 μM) bei 87,6%, mit UCN-01 (0,1 μM) bei 56,1% und mit UCN-01 (0,2 μM) bei 41,6%. Bei der Kombination der beiden Therapeutika betrugen sie 29,5% (1,5 μM CPT-11 + 0,1 μM UCN-01) und 28,2% (1,5 μM CPT-11 + 0,2 μM UCN-01). Die toxische Wirkung von UCN-01 war hier von Bedeutung und es ist daher nicht eindeutig erkennbar, ob es sich um eine additive oder synergistische Wirkung handelte.

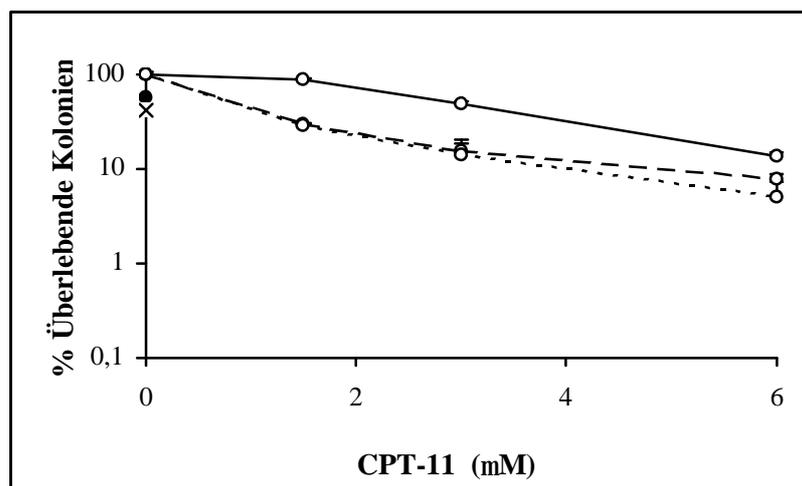


Abb. 32: Verstärkte Toxizität von CPT-11 durch die Behandlung von HT 29 Zellen mit CPT-11 und UCN-01. CPT-11 (—○—), CPT-11 mit 0,1 μM UCN-01 (--○--) und CPT-11 mit 0,2 μM UCN-01 (···○···). Zytotoxische Wirkung nach Behandlung mit 0,1 μM UCN-01 (●) und 0,2 μM UCN-01 (x). Ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen.

In SW480 Zellen war nach der Kombination von CPT-11 mit 0,1 μM oder 0,2 μM UCN-01 eine protektive Wirkung durch die Kombination von UCN-01 mit CPT-11 zu beobachten (**Abb. 33**). Dieser Effekt zeigte sich erst bei höheren Konzentrationen von CPT-11.

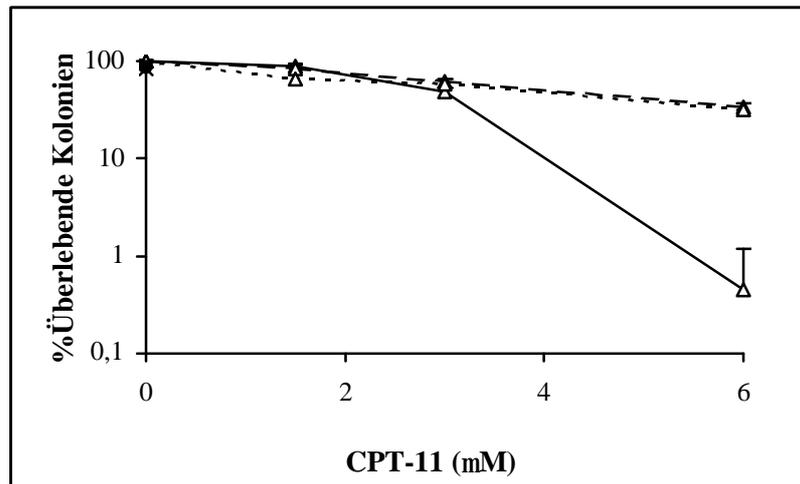


Abb. 33: Behandlung von SW480 Zellen mit CPT-11 und UCN-01. CPT-11 (— Δ —), CPT-11 mit 0,1 μM UCN-01 (- - Δ - -), CPT-11 mit 0,2 μM UCN-01 (· · · Δ · · ·). Es war nur eine geringfügig zytotoxische Wirkung nach Behandlung mit 0,1 μM UCN-01 (●) und 0,2 μM UCN-01 (x) zu beobachten. Ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen.

In HCT116+ch3 Zellen war nach Kombination von CPT-11 mit 0,1 μM oder 0,2 μM UCN-01 eine protektive Wirkung von UCN-01 zu beobachten (**Abb. 34**). Diese wurde bereits in HCT116+ch3 nach der Behandlung mit 5-FU und UCN-01 (**Abb. 29**) sowie in SW480 Zellen nach der Behandlung mit CPT-11 und UCN-01 (**Abb. 33**) beobachtet.

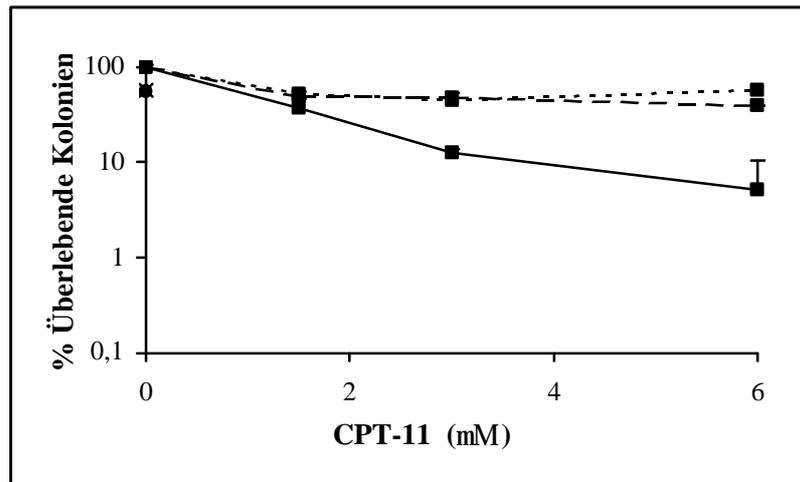


Abb. 34: Protektiver Effekt nach Behandlung von HCT116+ch3 Zellen mit CPT-11 und UCN-01, unabhängig von der UCN-01 Konzentration. CPT-11 (—■—), CPT-11 mit 0,1 μM UCN-01 (—■—), CPT-11 mit 0,1 μM UCN-01 (· · ·■· · ·). Wirkung von 0,1 μM UCN-01 (●) und 0,2 μM UCN-01 (x). Die Kurven zeigen ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Es sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen dargestellt.

Zwischenergebnis:

Die Potenzierung der Wirkung von den beiden Chemotherapeutika 5-FU und CPT-11 durch UCN-01 war vom p53-Status unabhängig. Sie ließ sich sowohl in p53^{mut}- (HT 29 und SW480) als auch in p53^{wt}- (CSC-1 und NCM460) Zelllinien nachweisen. In HCT116+ch3 (p53^{wt}) war eine Verstärkung der zytotoxischen Wirkung durch UCN-01 jedoch weder in Kombination mit 5-FU noch mit CPT-11 nachzuweisen. In beiden Fällen war ein protektiver Effekt durch die Kombination der beiden Chemotherapeutika zu beobachten.

Es wurden daher nach einem anderen Behandlungsschema (**Abb. 35**) die Zellen zunächst mit CPT-11 geschädigt und sodann UCN-01 mit Verzögerungen von 8 und 24 Stunden hinzugegeben. Die Behandlung mit CPT-11 erfolgte 24 Stunden nach der Aussaat der Zellen. Die Zugabe von UCN-01 (0,1 µM) fand 32 Stunden oder 48 Stunden nach Aussaat statt. 72 Stunden nach der Aussaat wurden die Zellen gewaschen und mit frischem Medium inkubiert.

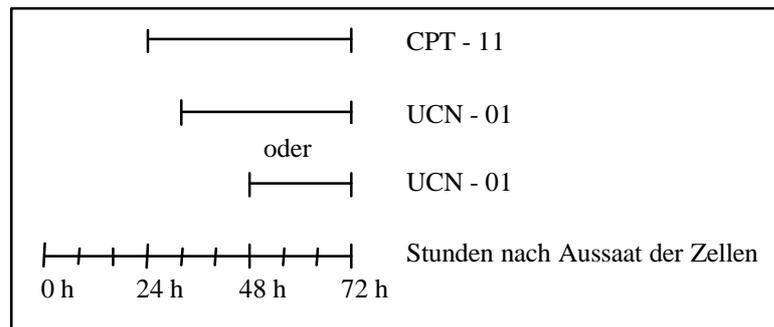


Abb 35.: Behandlungsschema des in **Abb. 36** dargestellten Experiments.

Die protektive Wirkung von UCN-01 in HCT116+ch3 Zellen ließ sich auch nach Anwendung des veränderten Behandlungsschemas beobachten (**Abb. 36**). Die Zugabe von UCN-01 nach Ablauf von 24 Stunden nach der CPT-11-Gabe zeigte einen stärker protektiven Effekt als die Zugabe von UCN-01 nach 8 Stunden. Im Vergleich zum vorher angewandten Behandlungsschema war bei der Gabe von UCN-01 8 Stunden nach CPT-11-Gabe der protektive Effekt geringer ausgeprägt, während er 24 Stunden nach CPT-11-Gabe unabhängig vom Behandlungsschema ähnlich ausgeprägt war. Somit hatte die Änderung des Behandlungsschemas in diesem Fall keine wesentliche Auswirkung auf die Wirkung von UCN-01.

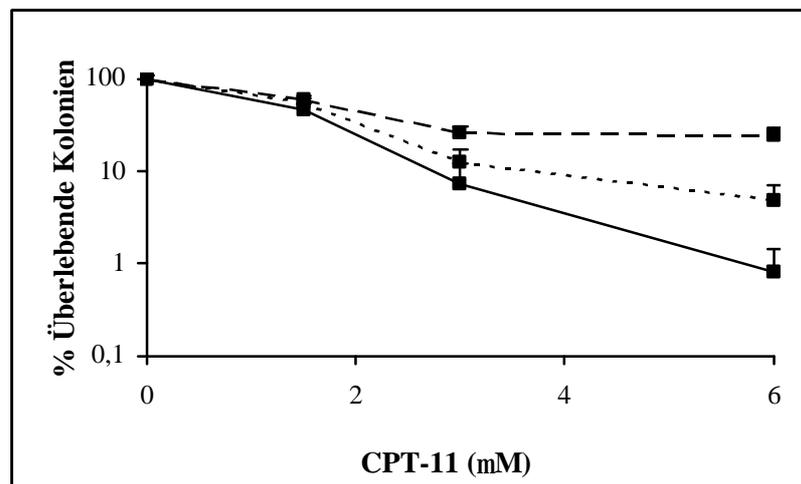


Abb. 36: Protektive Wirkung von UCN-01 auch nach Veränderung des Behandlungsschemas. Behandlung von HCT116+ch3 Zellen mit CPT-11 und 0,1 μ M UCN-01. CPT-11 (—■—), CPT-11 0,1 μ M und UCN-01 nach 8 h (—■—), CPT-11 und 0,1 μ M UCN-01 nach 24 h (···■···). Die Kurven zeigen ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen.

In CSC-1 und NCM460 Zellen verstärkten 0,1 μM oder 0,2 μM UCN-01 die Wirkung von CPT-11 (Abb. 37, Abb. 38). Jedoch war die bereits bei der Kombination von 5-FU mit UCN-01 (Abb. 30, Abb. 31) beschriebene zytotoxische Wirkung von UCN-01 in diesen beiden Zelllinien stärker ausgeprägt als in den anderen untersuchten Zelllinien: Bei den CSC-1 Zellen überlebten nach Behandlung mit UCN-01 (0,1 μM) 47,9% der Kolonien und nach UCN-01 (0,2 μM) 43,6%. In NCM460 Zellen waren es nach Behandlung mit UCN-01 (0,1 μM) 48,3% und nach UCN-01 (0,2 μM) 46,5% der Kolonien. Somit ist auch hier von einer additiven Wirkung der beiden Chemotherapeutika auszugehen.

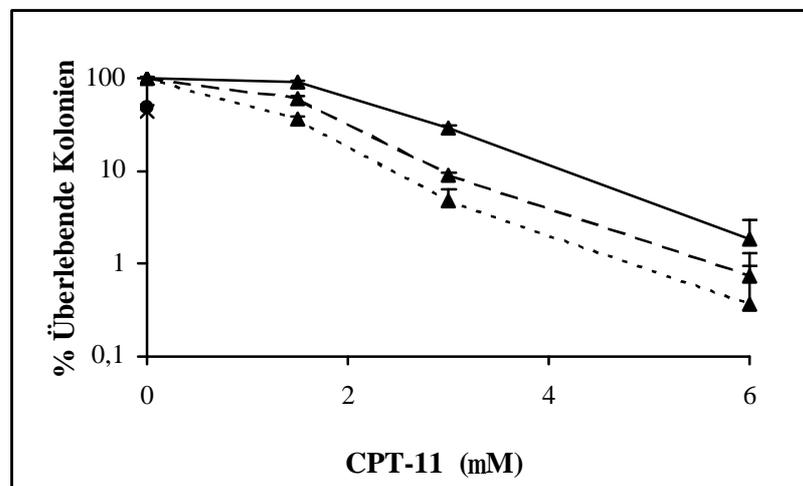


Abb. 37: Behandlung von CSC-1 Zellen mit CPT-11 und UCN-01. CPT-11 (—▲—), CPT-11 mit 0,1 μM UCN-01 (--▲--), CPT-11 mit 0,2 μM UCN-01 (···▲···). Zytotoxische Wirkung nach Behandlung mit 0,1 μM UCN-01 (●) und 0,2 μM UCN-01 (x). Die Kurven zeigen ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Es sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen dargestellt.

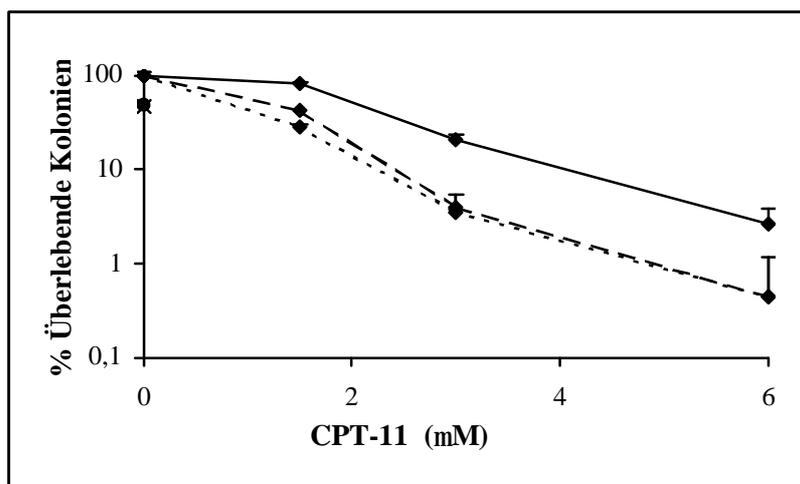


Abb. 38: Kombination von CPT-11 mit UCN-01 in NCM460 Zellen. CPT-11 (—◆—), CPT-11 mit 0,1 μM UCN-01 (---◆---), CPT-11 mit 0,2 μM UCN-01 (···◆···). Zytotoxische Wirkung von 0,1 μM UCN-01 (●) und 0,2 μM UCN-01 (x). Die Kurven zeigen ein Ergebnis von mindestens drei sich nicht signifikant unterscheidenden Ergebnissen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Messwerten mit Standardabweichungen.

Zusammenfassung:

In **Tabelle 9** sind die Ergebnisse der Wirkung von UCN-01 auf die Zytotoxizität von 5-FU und CPT-11 zusammengefasst.

Tabelle 9: Zusammenfassung des Einflusses von UCN-01 auf die Wirkung von 5-FU und CPT-11.

Zelllinie	5-FU + UCN-01	CPT-11 + UCN-01
HT 29	potenzierende Wirkung	potenzierende Wirkung
SW480	geringe potenzierende Wirkung	protektive Wirkung
HCT116+ch3	geringe protektive Wirkung	protektive Wirkung
NCM460	potenzierende Wirkung	potenzierende Wirkung
CSC-1	potenzierende Wirkung	potenzierende Wirkung

Kombination von 5-FU mit UCN-01:

1. In den beiden $p53^{mut}$, MMR^+ -Zelllinien (HT 29 und SW480 Zellen) zeigte die Kombination von 5-FU mit UCN-01 eine Verstärkung der Zytotoxizität von 5-FU (**Abb. 27, 28**). R. Magrini zeigte, dass in HCT116 Zellen ($p53^{-/-}$) nach CPT-11-Behandlung kaum Arrest in der G2/M-Phase des Zellzyklus jedoch Apoptose zu beobachten war. Durch UCN-01 zeigte sich noch weniger Arrest und vermehrt Apoptose, was eine Potenzierung der Wirkung durch UCN-01 erklären könnte.
2. In den $p53^{wt}$, MMR^+ -Zelllinien (NCM460 und CSC-1) war die Verstärkung der Wirkung von 5-FU durch UCN-01 ebenfalls zu beobachten (**Abb. 30, 31**). In diesen Zelllinien war die toxische Wirkung von UCN-01 allerdings stärker, so dass von einem additiven Effekt auszugehen ist.
3. In der $p53^{wt}$, MMR^+ -Zelllinie (HCT116+ch3) war keine Wirkungsverstärkung, sondern ein protektiver Effekt von UCN-01 zu beobachten (**Abb. 29**). Folgende Beobachtung von R. Magrini könnte die protektive Wirkung erklären: In HCT116+ch3 war nach Behandlung mit CPT-11 ein Arrest in der G2/M-Phase des Zellzyklus zu beobachten, der durch UCN-01 aufgehoben wurde und somit ein protektiver Effekt eintrat. Eine Aufhebung des durch 5-FU ausgelösten Zellzyklusstopps in der G1/S-Phase könnte die beschriebene protektive Wirkung erklären.
4. Die Ergebnisse entsprechen nicht der in der Literatur ursprünglich beschriebenen Annahme, dass eine Potenzierung der Wirkung anderer Chemotherapeutika durch UCN-01 nur in $p53^{mut}$ -Zelllinien auftritt (107-110). Diese anfängliche Behauptung wird auch durch neuere Veröffentlichungen korrigiert (111, 112).

Kombination von CPT-11 mit UCN-01:

1. In einer $p53^{mut}$, MMR^+ -Zelllinie (HT 29) zeigte die Kombination von CPT-11 mit UCN-01 ebenfalls eine Verstärkung der Zytotoxizität (**Abb. 32**), auf den bereits oben näher eingegangen wurde (s. Kombination von 5-FU mit UCN-01, Punkt 1).
2. In der anderen $p53^{mut}$, MMR^+ -Zelllinie (SW480) fand sich eine geringfügig protektive Wirkung (**Abb. 33**).
3. In den beiden $p53^{wt}$, MMR^+ -Zelllinien NCM460 und CSC-1 war eine Potenzierung der Wirkung von CPT-11 in Kombination mit UCN-01 zu beobachten (**Abb. 37, 38**).
4. In der $p53^{wt}$, MMR^+ -Zelllinie (HCT116+ch3) war keine Wirkungsverstärkung durch die Kombination von CPT-11 mit UCN-01 zu beobachten, sondern es wurde ein protektiver Effekt gefunden (**Abb. 34**), der bereits oben näher beschrieben worden ist (s. Kombination von 5-FU mit UCN-01, Punkt 3). Dieser Effekt zeigte sich auch nach einem veränderten Behandlungsschema (**Abb. 36**).
5. Somit ist die Wirkungsverstärkung von CPT-11 durch UCN-01 ebenfalls nicht nur in $p53^{mut}$ -Zellen zu beobachten.