

## 6 Diskussion

### 6.1 Einfluss des p21<sup>CIP1</sup>-Proteins auf die Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika: Vergleich von zwei Testmethoden

Wenn p21<sup>CIP1</sup> nicht oder nur vermindert exprimiert wird, entfällt der G1/S-Kontrollpunkt des Zellzyklus und dadurch die Möglichkeit zur Reparatur von DNA-Schäden. Die Zellen müssten demzufolge eine verstärkte Sensitivität gegenüber chemotherapeutischen Substanzen aufweisen.

Die hier untersuchten muzinösen Zelllinien mit einer hohen p21<sup>CIP1</sup>-Expression wiesen im MTT-Test eine geringere Sensitivität gegenüber 5-FU auf als die nicht-muzinösen Zelllinien mit einer niedrigen p21<sup>CIP1</sup>-Expression (**Abb. 1, 2**). Der klonogene Test bestätigte dieses Ergebnis jedoch nicht, da sich kein Zusammenhang zwischen der Expression von p21<sup>CIP1</sup> und der Sensitivität der Zelllinien gegenüber 5-FU zeigte (**Abb. 3, 4**). Die Sensitivität gegenüber CPT-11 wurde durch die Expression von p21<sup>CIP1</sup> in den verwendeten Zelllinien weder im MTT-Test noch im klonogenen Test beeinflusst (**Abb. 5-8**).

Die Resultate dieser Arbeit lassen sich mit den Ergebnissen von Roberta Magrini (aus derselben Arbeitsgruppe) vergleichen, die den Einfluss des p21<sup>CIP1</sup>-Proteins bereits in zwei isogenen Modellzellsystemen HCT116 (p53<sup>wt</sup>) mit und ohne p21<sup>CIP1</sup>-Expression sowie DLD1 (p53<sup>mut</sup>) mit und ohne Expression von p21<sup>CIP1</sup> untersuchte. Im MTT-Test reduzierte die Induktion des p21<sup>CIP1</sup>-Proteins die Sensitivität gegenüber 5-FU in DLD1 Zellen und erhöhte sie in HCT116 Zellen. Im klonogenen Test bestätigten sich diese Ergebnisse jedoch nicht, da in diesem Test die Expression von p21<sup>CIP1</sup> keinen Einfluss auf die Sensitivität der Zellen bei Behandlung mit 5-FU hatte. Die Sensitivität gegenüber CPT-11 wurde in den isogenen Zelllinien durch die Expression von p21<sup>CIP1</sup> nicht beeinflusst, was sowohl der MTT-Test als auch der klonogene Test zeigten. Somit konnten die im MTT-Test nachgewiesenen Unterschiede in der Chemosensitivität durch den klonogenen Test nicht bestätigt werden. Im klonogenen Test zeigte sich, dass das p21<sup>CIP1</sup>-Protein in den untersuchten Zelllinien keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber 5-FU und CPT-11 hatte.

Gegenüber Adriamycin war die Sensitivität von DLD1 Zellen durch die Überexpression von p21<sup>CIP1</sup> im klonogenen Test nicht beeinflusst (113). Dieser Befund entspricht den hier beschriebenen Ergebnissen an isogenen und etablierten Zelllinien mit 5-FU und CPT-11 im klonogenen Test. Dagegen zeigten Yang et al. mit Hilfe des klonogenen Tests, dass die

Induktion von p21<sup>CIP1</sup> die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika, einschließlich 5-FU und Topotekan, erhöht (114).

Die eigenen Ergebnisse und die anderer Arbeitsgruppen deuten somit darauf hin, dass p21<sup>CIP1</sup> nicht allein für die Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika verantwortlich ist und dass andere Eigenschaften der Zellen eine Rolle bei der Chemosensitivität spielen. Weiterhin zeigt der Vergleich der verschiedenen Ergebnisse, dass die Beurteilung der Sensitivität der Zellen von der verwendeten Substanz und der Nachweismethode abhängig ist.

Der Vergleich beider in dieser Arbeit verwendeten Methoden zeigt, dass der langfristige, im klonogenen Test messbare Effekt der Behandlung sich nicht immer korrekt aus dem kurzfristigen Ergebnis des MTT-Tests ableiten lässt. Zum Verständnis der verschiedenen Bestimmungsmethoden der Zytotoxizität von Chemotherapeutika ist der Ablauf des Zelltodes von Bedeutung. Eine Zelle, die nach einer Behandlung weiterhin ihre Fähigkeit zur Proliferation behält, hat die Behandlung überlebt, während eine Zelle, die nach einer Behandlung nicht mehr in der Lage ist, eine Kolonie zu bilden, als tot betrachtet wird, obwohl sie sich noch einige Male teilen und für eine gewisse Zeit überleben könnte. Der MTT-Test gibt die Abnahme der lebendigen Zellen im Vergleich zur Kontrolle an. Die verminderte Zellzahl und die daraus resultierende Signalreduktion im MTT-Test kann sowohl durch Zelltod als auch durch Wachstumsinhibition bedingt sein. Es findet keine Unterscheidung der beiden Faktoren statt. Der Zelltod wird bei einem frühen Zeitpunkt der Messung unterschätzt, da nicht alle Zellen direkt nach der Behandlung sterben, sondern je nach Zelltyp und Substanz erst Stunden bis Tage danach (115).

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass eine Überprüfung der Ergebnisse des MTT-Tests mit einem klonogenen Test notwendig ist. Ein Problem stellen bei diesem Test Zellen dar, die über eine längere Zeit in ihrem Wachstum gehemmt werden und beispielsweise in der G2/M-Zellzyklusphase arretiert sind. Diese Zellen werden bei der Zählung der Kolonien nicht berücksichtigt, wären jedoch zu einem späteren Zeitpunkt wieder zur Proliferation fähig. Folglich liefern beide Tests unterschiedliche Aussagen über das Verhalten der Zellen, so dass die Anwendung verschiedener Methoden notwendig ist, um Angaben über die Reaktion von Zellen auf chemotherapeutische Agenzien machen zu können. Bei Aussagen über die relative Sensitivität oder Resistenz von Zelllinien ist die Angabe der Testmethode, die der Aussage zugrunde liegt, notwendig.

## 6.2 Einfluss einer p53-Mutation auf die Chemosensitivität in Kolonkarzinomzellen

Da in etwa 60% sporadischer Kolonkarzinome eine p53-Mutation vorliegt, so dass p21<sup>CIP1</sup> nicht auf dem p53-abhängigen Weg exprimiert werden kann, entfällt in diesen Tumorzellen der von p53/p21<sup>CIP1</sup> kontrollierte Zellzyklusstopp, und die Zellen replizieren ihr Genom mit vorhandenen DNA-Schäden. Folglich ließe eine p53-Mutation eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika erwarten.

Die Experimente in dieser Arbeit zeigen, dass eine p53-Mutation in MMR<sup>+</sup>-Zellen die Resistenz gegenüber 5-FU und UCN-01 im klonogenen Test erhöhte (**Abb. 9, 13**), nicht jedoch gegenüber CPT-11 (**Abb. 11**). Bei Vorliegen eines Defektes im *mismatch repair* System, war die Sensitivität gegenüber den Therapeutika unabhängig vom p53-Status (**Abb. 10, 12, 14**).

Untersuchungen anderer Autoren bestätigen, dass p53<sup>mut</sup>-Zellen im klonogenen Test resistenter gegenüber verschiedenen Klassen chemotherapeutischer Substanzen, einschließlich 5-FU und Topotekan, waren (113, 116). Eine p53-Mutation führte auch in implantierten Kolonkarzinomen im Mausmodell zu einer erhöhten Resistenz gegenüber 5-FU (117). Zheng et al. zeigten, dass p53<sup>mut</sup>-Kolonkarzinomzelllinien eine geringere Chemosensitivität gegenüber 5-FU und Hydroxy-Camptothecin aufweisen als p53<sup>wt</sup>-Zelllinien (118). Auch Versuche mit SN-38, dem aktiven Metaboliten von CPT-11, weisen auf eine verminderte Sensitivität von p53<sup>mut</sup>-Zellen oraler Karzinome gegenüber p53<sup>wt</sup>-Zellen hin (119). In Xenograften von Kolon- (120) und Lungenkarzinomzellen (121) im Mausmodell zeigten p53<sup>mut</sup>-Zellen ebenfalls eine erhöhte Resistenz gegenüber CPT-11. Andere Arbeitsgruppen wiederum fanden in der Ovarialzelllinie A2780 (122) und in Mausfibroblasten (123) keinen Unterschied in der Sensitivität gegenüber SN-38 im klonogenen Test.

Dagegen wird von einigen Autoren auch eine erhöhte Resistenz von p53<sup>wt</sup>-Kolonkarzinomzellen gegenüber CPT-11 (124) und von Gliomzellen gegenüber Temozolomid (125) im klonogenen Test beschrieben. Diesen Zusammenhang erklären sie folgendermaßen: p53 ist notwendig, um den durch Chemotherapeutika ausgelösten G2/M-Zellzyklusstopp nach DNA-Schädigung zu erhalten, den Zellen eine Reparatur der DNA-Schäden zu ermöglichen und dadurch den Tod der Zelle zu verhindern. Allerdings scheint auch hier eine Abhängigkeit von den gewählten Therapeutika zu bestehen, da nach einer Behandlung mit 5-FU in p53<sup>wt</sup>-Kolonkarzinomzellen dieser langanhaltende G2/M-Stopp nicht stattfindet (126).

Gegenüber UCN-01 fanden Byrd et al., Husain et al. und Wang et al. keinen Unterschied in der Sensitivität von p53<sup>mut</sup>- und p53<sup>wt</sup>-Zelllinien (111, 127, 128). Bei dem in dieser Arbeit gezeigten Unterschied in der Sensitivität von p53<sup>mut</sup>- und p53<sup>wt</sup>-Zelllinien gegenüber UCN-01 handelt es sich um den Unterschied zwischen HCT116 Zellen einerseits und SW480 und HT 29 Zellen andererseits. Die Ergebnisse von Byrd et al., Husain et al. und Wang et al. sowie spätere Daten aus der eigenen Arbeitsgruppe an einem großen Zelllinienkollektiv sprechen dafür, dass der p53-Status auf die Sensitivität gegenüber UCN-01 keinen Einfluss hat und somit die Unterschiede in **Abb. 13** nicht repräsentativ sind.

Weiterhin ist von anderen Arbeitsgruppen untersucht worden, ob es eine Differenz in der durch UCN-01 ausgelösten Apoptose in p53<sup>mut</sup>- und p53<sup>wt</sup>-Zellen gibt. Nieves-Neira et al. sowie Shao et al. fanden keinen Hinweis auf eine Korrelation zwischen dem p53-Status und der Induktion von Apoptose (57, 129).

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit und der Literatur wird ersichtlich, dass p53<sup>mut</sup>-Zellen nicht grundsätzlich eine höhere Resistenz gegenüber Chemotherapeutika aufweisen als p53<sup>wt</sup>-Zelllinien.

### 6.3 Einfluss eines Defektes im *mismatch repair* System

Ein Defekt im *mismatch repair* System verhindert die Korrekturmöglichkeit von Basenfehlpaarungen vor der Mitose einer Zelle. Demzufolge könnte bei Zellen mit einem Defekt im MMR-System eine höhere Resistenz gegenüber Chemotherapeutika erwartet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein Defekt im *mismatch repair* System in p53<sup>wt</sup>-Zellen die Resistenz gegenüber 5-FU und UCN-01 im klonogenen Test erhöhte (**Abb. 15, 16, 20**). Bei der Behandlung mit CPT-11 beeinflusste weder eine p53-Mutation noch ein Defekt im MMR-System die Sensitivität der Zellen im klonogenen Test (**Abb. 11, 12, 18, 19**). Bei Vorliegen einer p53-Mutation reagierten die Tumorzellen unabhängig vom Zustand ihres MMR-Systems auf die verwendeten Substanzen (**Abb. 17, 19, 21**).

Auch in anderen Studien waren im klonogenen Test MMR<sup>-</sup>-Zelllinien (HCT116, HCT116+ch2, LoVo) resistenter gegenüber 5-FU als MMR<sup>+</sup>-Zelllinien (HCT116+ch3, SW480) (126,130). Für CPT-11 wurde in Xenograften isogener Zelllinien kein Unterschied in der Sensitivität, bezogen auf den MMR-Status, beobachtet (131, 120). Dies entspricht den

hier dargestellten Ergebnissen. Jacob et al. beschreiben einen Zusammenhang zwischen einem Defekt im *mismatch repair* System in Kolonkarzinomen und einer erhöhten Sensitivität gegenüber den Topoisomeraseinhibitoren Camptothecin und Etoposid (95). Dort wurden jedoch MTT-Tests durchgeführt, die nicht durch klonogene Tests überprüft wurden. Dies deutet auf den in Punkt 6.1 diskutierten Unterschied zwischen MTT- und klonogenem Test hin.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und Daten aus der Literatur zeigen, dass die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Chemotherapeutika nicht im Bezug auf eine einzelne Mutation ausgewertet werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde die Abhängigkeit einer p53-Mutation und des MMR-Status demonstriert. Es ist anzunehmen, dass eine Auswertung, die gleichzeitig mehrere Läsionen einbezieht, bessere prädiktive Aussagen ermöglichen würde.

Die klinischen Daten zeigen, dass Patienten mit MMR<sup>-</sup>-Kolonkarzinomen höhere Überlebensraten als Patienten mit MMR<sup>+</sup>-Kolonkarzinomen aufweisen. Eine retrospektive klinische Studie mit 35 Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom weist auf einen Zusammenhang zwischen Mikrosatelliteninstabilität und einem besseren Ansprechen auf die Behandlung mit CPT-11 hin (132). Eine günstigere Prognose nach adjuvanter Chemotherapie mit 5-FU für Patienten mit Tumoren, in denen eine Mikrosatelliteninstabilität vorliegt, weisen auch Studien von Hemminki et al., Elsaleh et al. und Gryfe et al. nach (133-135). Dieser Widerspruch zwischen den klinischen und den *in vitro* Ergebnissen ist bisher ungeklärt.

#### **6.4 Mechanismus der Zytotoxizität von 5-FU in Abhängigkeit vom p53- und MMR-Status**

Um die dargestellte Abhängigkeit der Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika vom p53- und MMR-Status der Zellen zu erklären, wurden verschiedene Formen der zellulären Reaktion auf Zytostatika untersucht. Eine verstärkte Empfindlichkeit ließe eine Steigerung der Apoptose oder der Seneszenz der Zellen vermuten.

In den Ergebnissen dieser Arbeit zeigte sich, dass sowohl der p53-Status als auch der MMR-Status keinen Einfluss auf die Apoptose und Seneszenz der Zellen hatte (**Abb. 22-25**). Andere Autoren konnten nachweisen, dass 5-FU-Behandlung Apoptose in normalen und in Tumorzellen induziert (99). Es konnte jedoch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem p53-Status und der Sensitivität gegenüber 5-FU gezeigt werden (113, 136).

Andere bekannte Apoptoseregulatoren, die bereits untersucht wurden, sind Proteine der Bcl-2 Familie wie Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Bax. Mutationen im Bax-Gen sind in einigen Kolonkarzinomen beschrieben worden, die meisten im Zusammenhang mit einem Defekt im *mismatch repair* System (103). Es wurde angenommen, dass das Verhältnis von Bcl-x<sub>L</sub> zu Bax mit der Chemosensitivität gegenüber 5-FU zusammenhängt (99). Ein von Violette et al. beschriebenes Problem ist der Unterschied der kurzen Behandlung *in vitro* (24-72 Stunden) und der längeren Behandlung *in vivo* (mehrere Tage) (103). Um die Situation *in vivo* besser zu reproduzieren, wurden von dieser Arbeitsgruppe die IC<sub>50</sub>-Bestimmungen mit Hilfe des MTT-Tests nach 6 Tagen Behandlung mit 5-FU durchgeführt. Die Sensitivität gegenüber 5-FU konnte jedoch anhand des p53- und des Bax-Status nicht vorausgesagt werden. Daten von Hawn et al. sprechen dafür, dass Apoptose in den MMR<sup>+</sup>-Zellen durch einen verlängerten G2/M-Zellzyklusarrest weitgehend verhindert wird (137).

In der vorliegenden Arbeit konnte zwischen der Empfindlichkeit der Zellen und der Seneszenz kein Zusammenhang gefunden werden, da sich in den behandelten Zellen nur in der Zelllinie LS 174T ein Hinweis auf seneszente Zellen in der SA-β-Gal-Färbung zeigte. Te Poele et al. weisen darauf hin, dass nach CPT-11-Behandlung das p53-Protein über die Aktivierung von p21<sup>CIP1</sup> und Zellarrest an der Induktion zellulärer Seneszenz beteiligt zu sein scheint (85). Nach Behandlung mit Topoisomeraseinhibitoren wurde Seneszenz nur in p53<sup>wt</sup>-Zellen beobachtet, während p53<sup>mut</sup>-Ovarial- und Kolonkarzinomzellen dagegen einen vorübergehendem S/G2-Arrest mit nachfolgender Apoptose zeigten (85).

Somit gibt es Hinweise darauf, dass sowohl Apoptose als auch Seneszenz als Reaktion auf eine zytostatische Therapie eine Rolle spielen. In der vorliegenden Arbeit konnte die unterschiedliche Empfindlichkeit der Zelllinien in Abhängigkeit vom p53- und MMR-Status nach 5-FU-Behandlung jedoch nicht durch Unterschiede in der Apoptose oder der Seneszenz erklärt werden.

## **6.5 Einfluss der Läsionen in p53 und im MMR-System auf die modulatorische Wirkung von UCN-01**

Die initialen Befunde zur modulatorischen Wirkung von UCN-01 sprachen dafür, dass diese hauptsächlich in p53<sup>mut</sup>-Zellen stattfindet (107-110). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit anhand mehrerer Kolonkarzinomzelllinien überprüft.

In den p53<sup>mut</sup>-Zelllinien zeigte die Kombination von 5-FU oder CPT-11 mit UCN-01 eine verstärkte Zytotoxizität (**Abb. 27, 28, 32**). Diese Beobachtung bestätigt die Theorie, dass in p53<sup>mut</sup>-Zellen UCN-01 in Kombination mit 5-FU oder CPT-11 die Wirkung durch Aufhebung der Zellzykluskontrollpunkte potenziert. Eine Ausnahme stellt die p53<sup>mut</sup>-Zelllinie SW480 dar, bei der nach der Kombination von CPT-11 mit UCN-01 eine protektive Wirkung beobachtet wurde (**Abb. 33**).

In der p53<sup>wt</sup>-Zelllinie HCT116+ch3 zeigte die Kombination von 5-FU oder CPT-11 mit UCN-01 eine protektive Wirkung (**Abb. 29, 34**). Diese Wirkung war nach einem veränderten Behandlungsschema, bei dem die Zellen zuerst mit CPT-11 geschädigt wurden und UCN-01 mit Verzögerungen von 8 und 24 Stunden hinzugegeben wurde, ebenfalls zu beobachten (**Abb. 36**).

Magrini et al. fanden heraus, dass die Behandlung mit CPT-11 in HCT116+ch3 Zellen zu einem verlängerten G2/M-Arrest führt, der durch UCN-01 aufgehoben wird. Diese Arrestaufhebung könnte für den protektiven Effekt verantwortlich sein (138).

Auch in CSC-1 und NCM460 Zellen potenzierte UCN-01 die Zytotoxizität von 5-FU und CPT-11, obwohl bei diesen Zellen ein p53<sup>wt</sup>-Status anzunehmen ist (**Abb. 30, 31, 37, 38**). Chen et al. fanden heraus, dass normale Zellen wesentlich empfindlicher auf UCN-01 reagieren als Tumorzellen (139). Dies stimmt mit der beobachteten starken zytotoxischen Wirkung von UCN-01 auf CSC-1 und NCM460 Zellen überein. In weiteren Untersuchungen müsste der p53-Status dieser beiden Zelllinien überprüft und andere p53<sup>wt</sup>-Zelllinien untersucht werden, um bestätigen zu können, dass eine Potenzierung der Wirkung durch die Kombination von UCN-01 mit 5-FU unabhängig vom p53-Status der Zellen ist.

Synergistische Effekte durch die Kombination von UCN-01 mit anderen Chemotherapeutika wurden in p53<sup>mut</sup>-Zellen bereits für Camptothecin (129, 140), 5-FU (108, 143, 144), Cisplatin (140-142) und Mitomycin C (107, 143) beschrieben. In Ovarialkarzinomzellen war die Wirkungsverstärkung von Cisplatin durch UCN-01 unabhängig vom p53-Status der Zellen zu beobachten (127). Ein Synergismus von UCN-01 und Mitomycin C, Cisplatin und 5-FU konnte auch *in vivo* in Xenograften epidermoider Tumoren gezeigt werden (143). Dabei scheint sowohl eine Verkürzung der S-Phase (129) als auch die Aufhebung des G2/M-Kontrollpunktes (140, 141) eine Rolle zu spielen. In der Kombination mit Adriamycin, Vincaalkaloiden, Methotrexat und Taxol konnten wiederum keine synergistischen Effekte

beobachtet werden (143), was darauf hinweist, dass den unterschiedlichen Wirkungsmechanismen der Chemotherapeutika eine entscheidende Bedeutung zukommt.

Weiterhin stellt sich die Frage nach der beschriebenen Selektivität von UCN-01 für p53<sup>mut</sup>-Zellen. Tumoren, in denen der von p53/p21<sup>CIP1</sup> kontrollierte Zellzyklusstopp in der G1/S-Phase entfällt, benötigen für das Überleben nach DNA-Schädigung den Zellzyklusstopp in der G2/M-Phase. UCN-01 verkürzt diesen Zellzyklusstopp und führt zu einer Verstärkung der Zytotoxizität in Kombination mit anderen Chemotherapeutika. Ein Abbruch des G2/M-Zellzyklusstopps wurde jedoch sowohl in p53<sup>mut</sup>- als auch in p53<sup>wt</sup>-Zellen beschrieben (107, 145) und kann daher nicht den Unterschied in der Wirkung von UCN-01 zwischen p53<sup>wt</sup>- und p53<sup>mut</sup>-Zellen erklären. Die verminderte Induktion von p21<sup>CIP1</sup> könnte zu der erhöhten Apoptoserate in p53<sup>mut</sup>-Zelllinien beitragen (145).

Demzufolge sind zur Klärung des Mechanismus der Wirkungsverstärkung weitere Untersuchungen notwendig. In klinischen Studien zeigte sich, dass eine freie Plasmakonzentration von UCN-01 um 100 nM noch keine wesentlichen toxischen Wirkungen auslöst (146), so dass eine therapeutische Nutzung des potenzierenden Effektes von UCN-01 in Kombination mit anderen Chemotherapeutika möglich erscheint. Dies ist besonders für die gegenwärtige Anwendung von CPT-11 bei Patienten mit Kolonkarzinomen von Bedeutung, da die zur Zeit verwendeten Dosierungen sehr starke, gelegentlich letale, Nebenwirkungen hervorrufen.